



**Inês Carolina
Figueiredo Pereira**

**Membranas à base de Quitosano e Polietilenoglicol
com propriedades antibacterianas para a
regeneração de tecidos**



**Inês Carolina
Figueiredo Pereira**

**Membranas à base de Quitosano e Polietilenoglicol
com propriedades antibacterianas para a
regeneração de tecidos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizado sob a orientação científica do Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, e da Professora Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e namorado pelo incansável apoio e carinho. Dedico também aos meus avós Tila e Fausto, de quem sinto tanta falta.

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria da Piedade Moreira Brandão
Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João Filipe Colardelle da Luz Mano
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira
Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Reservo este espaço para agradecer a todas as pessoas que foram fundamentais na elaboração desta dissertação. Um muito obrigado a todos!

Em primeiro lugar, expresso os meus sinceros agradecimentos aos orientadores deste projeto. Ao Professor Doutor José Maria Ferreira, orientador do trabalho e Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, agradeço pelos conselhos imprescindíveis, pela simpatia e confiança, pelo acompanhamento e por todo o apoio prestado ao longo destes dois anos. À Professora Doutora Ana Sofia Duarte, co-orientadora deste projeto e Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, muito obrigada por todos os ensinamentos, disponibilidade, paciência e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, Mestres (e alunos de Doutoramento) Ana Sofia Neto e Bo Nan, muito obrigada pelo incansável apoio, prontificação, entejuda, boa disposição, e por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também às Doutoradas Susana Olhero e Paula Torres, aos Doutores Hugo Fernandes e Ajay Kaushal, ao Avito Rebelo e à Catarina Marques pelo acolhimento e disponibilidade.

À Professora Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, agradeço toda a ajuda e disponibilidade concedida na realização dos ensaios antibacterianos.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica agradeço pela ajuda prestada na realização dos mais diversos ensaios de caracterização dos materiais. Agradeço também à técnica Maria Celeste Azevedo do Departamento de Química pela disponibilidade na realização das análises FTIR e FTIR-ATR aos materiais desenvolvidos.

Por último, um enorme obrigada às pessoas mais importantes da minha vida: aos meus pais, Miguel e Anabela; aos meus irmãos, Mauro, Pedro e Beatriz; e ao meu namorado, Rui.

Aos meus pais, um muito obrigado por serem os meus heróis, por serem um exemplo de coragem, esforço e dedicação, e por estarem presentes em todos os momentos, sempre com boa disposição e carinho para oferecer. Aos meus irmãos agradeço todos os sorrisos, risadas e palhaçadas, e agradeço também por todo o carinho que me transmitem.

Ao Rui, agradeço de coração toda a atenção prestada, suporte, carinho, confiança, paciência e orientação. Obrigada por estares sempre do meu lado e por me aconselhares sempre da melhor forma. Obrigada também por me contagiares sempre com o teu sorriso e boa disposição!

Palavras-chave

Membranas de quitosano/polietilenoglicol, Fosfatos de cálcio, Óxido de zinco, Óxido de cobre, Propriedades antibacterianas, Regeneração de tecidos, Multifuncionalidade.

Resumo

A prevenção de infecções microbianas associadas a dispositivos médicos implantáveis e a feridas superficiais representa uma das principais estratégias de investigação na área dos biomateriais. Assim, o desenvolvimento de materiais que promovam a regeneração de tecidos danificados e que ao mesmo tempo impeçam a proliferação de seres patogênicos constitui um importante desafio. Nesse sentido, o presente estudo reporta o desenvolvimento de uma membrana compósita de matriz de quitosano (QS) e polietilenoglicol (PEG), com a incorporação de partículas de fosfatos de cálcio (CaP), óxido de zinco (ZnO) e óxido de cobre (CuO). O CaP visa promover a osteocondução necessária para a regeneração óssea, enquanto os óxidos metálicos deverão conferir propriedades antimicrobianas às membranas.

Os pós inorgânicos foram obtidos por síntese hidrotermal na presença de ureia como agente de precipitação. Os resultados de caracterização dos pós revelaram elevados níveis de pureza e de cristalinidade, e tamanhos de partícula nas escalas micro e nanométricas. A composição da matriz polimérica (QS/PEG=70/30%) mais adequada para a produção das membranas foi selecionada com base nos resultados de testes preliminares em que se avaliou a dependência da resistência mecânica à tração e capacidade de deformação, da proporção polimérica QS/PEG.

O teor mais promissor de ZnO e CuO a incorporar nas membranas compósitas foi determinado através de ensaios antibacterianos contra dois tipos de bactérias, Gram-positiva e Gram-negativa. Verificou-se que a adição de 1 % em peso de cada um dos óxidos metálicos (relativamente à massa do QS) promoveu uma inibição satisfatória do crescimento de ambos os tipos de microrganismos testados. Os resultados da avaliação das outras propriedades relevantes destas membranas revelaram: (i) a formação de ligações entre os grupos amina do QS e os íons fosfato do CaP, aos quais, por sua vez, se podem ligar os cátions divalentes cálcio, zinco e cobre. Estas espécies catiónicas podem também estabelecer ligações com terminais desprotonados localizados nas porções amina e/ou hidroxilo da matriz polimérica; (ii) a resistência à tração e percentagem de deformação das membranas compósitas foi semelhante à da membrana obtida com a mesma matriz polimérica (QS/PEG=70/30%); (iii) a imersão em fluido fisiológico simulado (SBF) promoveu uma biodegradação gradual ao longo do tempo de imersão, acompanhada de uma contínua deposição de partículas de CaP que originou a formação de uma camada apatítica uniforme à superfície da membrana.

A membrana compósita selecionada apresenta um conjunto de propriedades muito interessante, com aplicações potenciais na proteção de feridas superficiais, separação de tecidos moles e duros em cirurgias na área da medicina dentária, por exemplo, podendo ser também adequada para o revestimento de implantes ósseos, entre outras aplicações. Para o efeito será necessária a realização de estudos futuros mais aprofundados com vista a uma caracterização mais completa do material, nomeadamente, estudos de citotoxicidade *in vitro* que permitam apurar a sua biocompatibilidade.

Keywords

Chitosan/polyethyleneglycol membranes, Calcium phosphates, Zinc oxide, Copper oxide, Antibacterial properties, Tissue regeneration, Multifunctionality.

Abstract

The prevention of microbial infections associated with implantable medical devices and superficial wounds represents one of the main research strategies in the field of biomaterials. Thus, the development of materials that promote the regeneration of damaged tissues and at the same time prevent the proliferation of pathogens is an important challenge. In this sense, the present study reports on the development of a composite membrane of chitosan (QS) and polyethylene glycol (PEG) matrix incorporating particles of calcium phosphates (CaP), zinc oxide (ZnO) and copper oxide (CuO). CaP aims to promote osteoconduction necessary for bone regeneration, while metal oxides are expected to confer antimicrobial properties to the membranes.

The inorganic powders were obtained by hydrothermal synthesis using urea as a precipitating agent. The results of characterization of the powders revealed high levels of purity and crystallinity, and particle sizes in the micro and nanometric scales. The composition of the polymer matrix (QS/PEG=70/30%) most suitable for the production of the membranes was selected based on the results of preliminary tests in which the dependence of the tensile strength and deformation ability on the QS/PEG ratio was evaluated.

The most promising content of ZnO and CuO to be incorporated into the composite membranes was determined by antibacterial assays against two types of bacteria, Gram-positive and Gram-negative. It was found that the addition of 1% by weight of each metal oxide (relative to the mass of the QS) promoted satisfactory growth inhibition of both types of microorganisms tested. The results of the evaluation of the other relevant properties of these membranes revealed: (i) the formation of bonds between the QS amine groups and the phosphate ions of CaP, to which, in turn, can be bonded divalent calcium, zinc and copper cations. These cationic species can also bond to deprotonated portions that are located in amide and/or hydroxyl groups of the polymer matrix; (ii) the tensile strength and deformation percentage of the composite membranes was similar to the membrane obtained with the same polymer matrix (QS/PEG=70/30%); (iii) immersion in simulated physiological fluid (SBF) promoted a gradual biodegradation during the immersion time, accompanied by a continuous deposition of CaP particles that gave rise to a uniform apatite layer on the surface of the membrane.

The selected composite membrane presents a very interesting set of properties, with potential applications in the protection of superficial wounds, and in separating soft and hard tissues in surgeries in the area of dental medicine, for example. The composite membrane may also be suitable as coating material for bone implants, among other applications. For this purpose, further studies will be required in order to obtain a more complete characterization of the material, in particular, *in vitro* cytotoxicity studies in order to determine its biocompatibility.

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	vi
Abreviaturas.....	vii
 Capítulo 1 – Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Enquadramento	3
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Geral	5
1.2.2. Específicos.....	5
1.3. Estrutura da tese.....	6
 Capítulo 2 – Revisão da Literatura.....	7
2.1. Patogenia da infeção bacteriana.....	9
2.2. Biomateriais	13
2.2.1. Biomateriais anti-infeciosos	15
2.3. Quitosano	18
2.3.1. Produção	20
2.3.2. Membranas de quitosano	20
2.4. Biocompósitos à base de quitosano	22
2.4.1. Quitosano/polietilenoglicol	22
2.4.2. Quitosano/fosfatos de cálcio.....	24
2.4.3. Quitosano/óxido de zinco e cobre	27
2.5. Membranas multifuncionais à base de quitosano e polietilenoglicol com incorporação de micro e nanopartículas de fosfatos de cálcio, óxido de zinco e cobre – perspetivas	31
 Capítulo 3 – Procedimento Experimental.....	33
3.1. Síntese e caracterização dos pós.....	36
3.1.1. Síntese dos pós de CaP	37
3.1.2. Síntese dos pós de ZnO	38
3.1.3. Síntese dos pós de CuO	39
3.1.4. Técnicas de caracterização dos pós obtidos	39
3.2. Síntese de membranas com diferentes proporções QS/PEG	41

3.2.1. Caraterização espectroscópica da membrana com melhores propriedades mecânicas	45
3.3. Síntese e caraterização das membranas compósitas	46
3.3.1. Ensaaios antibacterianos.....	47
3.3.2. Caraterização espectroscópica.....	51
3.3.3. Avaliação da capacidade de biomineralização, biodegradação e morfologia da membrana	51
3.3.4. Avaliação das propriedades mecânicas	53
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	55
4.1. Caraterização dos pós de partida	57
4.1.1. Pós de CaP	57
4.1.2. Pós de ZnO	63
4.1.3. Pós de CuO	67
4.2. Avaliação mecânica das membranas com diferentes proporções entre QS/PEG .	71
4.2.1. Caraterização espectroscópica da membrana com melhores propriedades mecânicas	76
4.3. Caraterização das membranas compósitas.....	77
4.3.1. Propriedades antibacterianas	77
4.3.2. Caraterização espectroscópica.....	83
4.3.3. Avaliação da capacidade de biomineralização, biodegradação e morfologia da membrana	87
4.3.4. Propriedades mecânicas.....	89
Capítulo 5 – Conclusão e trabalhos futuros.....	93
5.1. Conclusão.....	95
5.2. Trabalhos Futuros	96
Capítulo 6 – Bibliografia	99
6.1. Bibliografia	101

Índice de figuras

Figura 1 – Mecanismos de patogenicidade das bactérias. (A) Mecanismos que levam à ligação entre a bactéria e a célula-alvo, e (B) processo invasivo após a ligação efetuada (Adaptado de [7]).....	11
Figura 2 – Formação de um biofilme bacteriano (Adaptado de [13]).	12
Figura 3 – Dispositivos médicos externos e internos (Adaptado de [19]).....	15
Figura 4 – Estrutura da quitina desacetilada (Adaptado de [24]).	18
Figura 5 – Estrutura do PEG (Adaptado de [34] e [35]).	22
Figura 6 – Ilustração da osteocondução promovida por um material à base de CaP (Adaptado de [40]).....	25
Figura 7 – Atividade antibacteriana das nanopartículas metálicas (Adaptado de [57]).	28
Figura 8 – Técnicas de produção de compósitos poliméricos dopados com micro e nanopartículas (Adaptado de [39]).	30
Figura 9 – Esquema alusivo aos passos envolvidos na produção dos pós.	37
Figura 10 – Fotografia da autoclave concebida no DEMaC para síntese dos pós.	38
Figura 11 – Fotografia dos moldes acrílicos concebidos no DEMaC para síntese das membranas a testar nos ensaios mecânicos.	42
Figura 12 – Esquema ilustrativo dos diferentes passos envolvidos na produção das membranas.....	44
Figura 13 – Aparato implementado na realização dos ensaios mecânicos à tração.	44
Figura 14 – Esquema alusivo à produção das membranas compósitas nas <i>multi-well</i>	47
Figura 15 – Fotografia de amostras dos pós de BCP, CuO e ZnO obtidos pela síntese hidrotermal.	57
Figura 16 – Difratoograma do pó de CaP sintetizado e picos de difração caraterísticos dos compostos HAp e β -TCP padrão.	58
Figura 17 – Espectro FTIR obtido para o pó BCP produzido.	59
Figura 18 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de BCP produzidas.	60
Figura 19 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós BCP com diferentes ampliações.	62
Figura 20 – Difratoograma do pó de ZnO sintetizado e picos de difração caraterísticos do ZnO padrão.	63
Figura 21 – Espectro FTIR obtido para o pó ZnO produzido.	64

Figura 22 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de ZnO produzidas.	65
Figura 23 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós ZnO com diferentes ampliações.	67
Figura 24 – Difratoograma do pó de CuO sintetizado e picos de difração caraterísticos do CuO padrão.	68
Figura 25 – Espectro FTIR obtido para o pó CuO produzido.	69
Figura 26 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de CuO produzidas.	70
Figura 27 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós CuO com diferentes ampliações.	71
Figura 28 – Membrana 50/50 % (QS/PEG %) produzida para os ensaios mecânicos.	72
Figura 29 – Gráfico da tensão de rutura (MPa) suportada pelas diferentes composições de membranas (50/50, 70/30 e 90/10 % – QS/PEG %). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). Asteriscos * e **** representam $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente.	73
Figura 30 – Ligações intermoleculares (hidrogénio) formadas entre o QS e o PEG (Adaptado de [94]).	74
Figura 31 – Gráfico da percentagem de deformação sofrida pelas diferentes composições de membranas (50/50, 70/30 e 90/10 % – QS/PEG %). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). Asteriscos *** e **** representam $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente.	75
Figura 32 – Espectros FTIR-ATR obtidos para a membrana formada unicamente por QS (a laranja) e para a membrana constituída por QS e PEG de proporção 70/30 % (a verde).	76
Figura 33 – Membranas produzidas para os ensaios antibacterianos (A e B – membranas no estado líquido; C – membranas no estado sólido).	78
Figura 34 – Tubos preparados para o ensaio com os materiais incorporados e na ausência dos mesmos (C – Controlo).	79
Figura 35 – Demonstração das contagens de UFC efetuadas nas placas de PCA com as diluições inoculadas: diluição 10^{-4} para <i>E. coli</i> (A) e 10^{-5} para a <i>S. aureus</i> (B), passado 24 horas de incubação. Cada placa corresponde a cada amostra testada, isto é, às diferentes composições de membrana e ao controlo.	80
Figura 36 – Determinação da atividade antimicrobiana das diferentes composições de membranas (norma ASTM E2149 – 10). Contagens de (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	

(UFC/ml); (C) Percentagem de redução do crescimento bacteriano, para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , promovida pelas diferentes composições de membrana testadas (0 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 % e 2 % – percentagem em peso de óxidos metálicos relativa à massa do QS). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Asteriscos *, **, *** e **** representam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente. “ns” representa diferença estatisticamente não-significativa.....	81
Figura 37 – Espectros FTIR-ATR obtidos da membrana QS/PEG, da membrana dopada (QS/PEG+BCP/CuO/ZnO), e dos pós BCP, CuO e ZnO.....	84
Figura 38 – Ilustração sugestiva da ligação entre os grupos amina do QS e os iões fosfato do BCP, que por sua vez se encontram ligados aos catiões divalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (Adaptado de [104]).....	85
Figura 39 – Ilustração sugestiva da ligação entre grupos amina e/ou hidroxilo da matriz polimérica e os catiões divalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (Adaptado de [105]).	86
Figura 40 – Micrografias obtidas com diferentes ampliações (x100 e x2000) para as membranas incubadas em SBF durante: A e B – 0 dias; C e D – 3 dias; E e F – 7 dias; e G e H – 14 dias.	88
Figura 41 – Membrana compósita produzida para os ensaios mecânicos (A e B – membrana “mãe”; C – réplica adquirida).	90
Figura 42 – Comparação das propriedades mecânicas das membranas não dopada e dopada (com 1 % em peso de óxidos metálicos – percentagem relativa à massa do QS). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). “ns” representa diferença estatisticamente não-significativa, e asterisco * representa $p \leq 0,05$	90

Índice de tabelas

Tabela 1 – Características dos CaP mais utilizados na indústria biomédica (Adaptado de [43]).	26
Tabela 2 – Gama de concentrações de ZnO e CuO testadas nas quais se atingem boas propriedades antibacterianas e/ou viabilidade celular.	48
Tabela 3 – Composição das membranas preparadas para os testes antibacterianos.....	48
Tabela 4 – Composição química da solução de SBF (Adaptado de [82]).....	52
Tabela 5 – Concentração iónica (10^{-3} mol) no SBF e no plasma sanguíneo humano (Adaptado de [82]).....	53
Tabela 6 – Percentagens das fases cristalinas HAp e β -TCP presentes no pó de CaP sintetizado.....	58
Tabela 7 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de BCP.	61
Tabela 8 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de ZnO.....	66
Tabela 9 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de CuO.	70
Tabela 10 – Dimensões das membranas utilizadas nos ensaios mecânicos.	72

Abreviaturas

QS	Quitosano
PEG	Polietilenoglicol
CaP	Fosfato de Cálcio
ZnO	Óxido de Zinco
CuO	Óxido de Cobre
SBF	Fluido Fisiológico Simulado
IUDS	<i>Intrauterine Devices</i>
NH ₂	Grupos amina
\overline{GA}	Grau médio de acetilação
\overline{GD}	Grau médio de desacetilação
ADN	Ácido desoxirribonucleico
mARN	Ácido Ribonucleico mensageiro
NaOH	Hidróxido de Sódio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAp	Hidroxiapatite
TCP	Fosfato tricálcico
β -TCP	β -Fosfato tricálcico
α -TCP	α -Fosfato tricálcico
ROS	Espécies reativas do oxigénio
O ²⁻	Ião Superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
OH ⁻	Ião Hidróxido
CO(NO ₃) ₂	Ureia
NH ₄ ⁺	Ião Amónia
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	Nitrato de Cálcio 4-Hidratado
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato de diamónio
DEMaC	Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica
N ₂ O ₆ Zn · 6H ₂ O	Nitrato de Zinco 6-Hidratado
CuN ₂ O ₆ · 3H ₂ O	Nitrato de Cobre 3-Hidratado

DRX	Difração de Raios-X
PDF	<i>Powder Diffraction Files</i>
ICCD	<i>International Center for Diffraction Data</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
KBr	Brometo de potássio
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
T _{amb}	Temperatura Ambiente
FTIR-ATR	FTIR no modo de Refletância Total Atenuada
ATR	Refletância Total Atenuada
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC _C	Média do número de UFC contadas para o Controlo
UFC _A	Média do número de UFC contadas para a Amostra
F _D	Fator de Diluição
V _S	Volume de Suspensão inoculada
CO ₃ ²⁻	Ião Carbonato
PO ₄ ³⁻	Ião Fosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
One-way ANOVA	ANOVA com um fator
<i>p</i>	Probabilidade de significância
<i>n</i>	Número de réplicas

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Enquadramento

Os biomateriais e dispositivos médicos têm vindo a ser cada vez mais utilizados nos mais variados ramos da medicina, desde a medicina regenerativa e engenharia de tecidos, à instrumentação hospitalar e biossensores de controlo e monitorização de parâmetros clínicos. Os avanços tecnológicos realizados na área dos biomateriais têm resultado num elevado nível de otimização e seleção de materiais ao nível macro, micro e nanométrico com propriedades adequadas à aplicação médica. A crescente biocompatibilidade e bioatividade que tem sido atingida nestes dispositivos, associada à diminuição do risco de ocorrências inflamatórias e à consequente diminuição da falha do material; a crescente procura por cuidados médicos por parte de uma população cada vez mais envelhecida; e a necessidade de serem encontradas soluções que permitam um aumento da esperança média de vida; são alguns dos fatores que têm contribuído para a expansão bem-sucedida do uso de dispositivos médicos a nível mundial¹.

De entre as mais variadas áreas de atuação dos materiais ao nível da medicina regenerativa, a sua aplicação no combate às infeções microbianas é da maior importância. As infeções microbianas, causadas por bactérias, fungos e outros seres patogénicos, constituem um grave problema de saúde, especialmente no que diz respeito à cicatrização de feridas e à invasão destes seres em implantes biomédicos e dispositivos percutâneos. As espécies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), e espécies do género *Candida* são exemplos de microrganismos normalmente associados a este tipo de infeções. Estas podem prolongar ou prejudicar o processo de cicatrização de feridas, o que pode resultar em septicemia que advém da infeção sistémica secundária provocada pela infeção primária que acometeu o local da ferida. Quanto à proliferação destes seres na interface implante/tecido, esta pode levar à falha do implante com possível necessidade de remoção e substituição do mesmo. Em ambiente hospitalar, uma simples colocação de um cateter não totalmente esterilizado no organismo, pode ter como consequência a atuação do dispositivo como um veículo à introdução da infeção do ambiente para o doente. Desta forma, têm surgido ao longo dos anos estudos com diferentes estratégias de desenvolvimento de materiais com atividade antimicrobiana de modo a prevenir ou tratar infeções. Estes materiais podem ser impregnados com diferentes agentes antimicrobianos, como os antibióticos, que são libertados de forma controlada ao longo do tempo, ou, por

outro lado, o material pode ser formulado de modo a possuir por si só capacidade de vencer os agentes patogénicos que se desenvolvem².

Existem várias abordagens diferentes quanto à formulação e produção de sistemas com propriedades antimicrobianas que impeçam a formação de biofilmes infecciosos. Estas incluem, por exemplo, o desenvolvimento de materiais com características superficiais repelentes e anti-adesivas para os microrganismos, materiais bioativos com propriedades antimicrobianas intrínsecas, que podem ser utilizados tanto como simples revestimentos ou como materiais implantáveis no seu todo, materiais nanoestruturados, materiais com capacidades de libertação controlada de fármacos, entre outras possibilidades. De entre os biomateriais intrinsecamente antimicrobianos destacam-se os metais, como a prata, zinco e cobre, alguns biopolímeros, e vários vidros bioativos³. Os biopolímeros têm sido amplamente utilizados na forma de membranas como revestimentos bioativos anti-infecciosos, com aplicação em próteses maxilofaciais e neurais, reparação de hérnias e cicatrização de feridas. De modo a incrementar a capacidade antimicrobiana destes revestimentos, têm sido incorporadas micro e nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos com concentrações, formas, tamanhos e composições químicas específicas para o tipo de membrana utilizada e respetiva aplicação^{3,4}. Além dos pós metálicos, pós à base de compostos que promovam a regeneração dos tecidos, tal como o fosfato de cálcio (CaP), são um valor acrescentado aos sistemas implementados⁵. O desenvolvimento de compósitos dopados com estes materiais de dimensões reduzidas torna-se crucial para que sejam atingidas boas capacidades de indução à regeneração de tecidos danificados, ao mesmo tempo que são apresentadas propriedades antibacterianas ótimas que impeçam a proliferação de seres patogénicos em locais fragilizados.

Para qualquer aplicação dos materiais nas mais variadas áreas de atuação, é de maior relevância que se analisem as vantagens e desvantagens inerentes a cada tipo de material. Neste sentido, o desenvolvimento de compósitos que possibilitem a combinação de vários materiais de interesse veio contribuir a formulação de sistemas que beneficiam das vantagens inerentes a cada composto utilizado, diminuindo ou eliminando o impacto das falhas que cada material apresenta³.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de membranas compósitas multifuncionais à base de QS e PEG, onde serão incorporadas partículas de pós de CaP, óxido de zinco (ZnO) e cobre (CuO). As partículas de CaP têm como principal finalidade conferir às membranas uma capacidade melhorada na regeneração de tecidos danificados, enquanto a adição dos pós de óxidos metálicos visa contribuir para as suas propriedades antibacterianas. O conjunto formado pela membrana polimérica carregada com os pós cerâmicos terá como principal aplicação o revestimento da superfície de implantes, podendo também ser aplicado no tratamento de feridas.

1.2.2. Específicos

As proporções mais adequadas entre os polímeros da matriz (QS + PEG) serão determinadas através de testes preliminares realizados às membranas não dopadas. Os pós serão depois incorporados e o seu impacto nas propriedades relevantes das membranas será avaliado. Assim, os principais objetivos experimentais a cumprir são:

- Preparar os pós de CaP, ZnO e CuO, e caracterizar os mesmos quanto às fases cristalinas que apresentam, natureza química, distribuição granulométrica e microestrutura;
- Preparar membranas com diferentes proporções de QS/PEG e avaliar a resistência mecânica à tração e percentagem de deformação de cada composição formulada, de modo a que seja selecionada a composição polimérica que apresente propriedades mecânicas mais promissoras;
- Elaborar as membranas compósitas de QS/PEG com a incorporação das partículas cerâmicas (CaP, ZnO e CuO) e caracterizá-las quanto às propriedades mais relevantes, incluindo atividade antibacteriana, avaliação da microestrutura e das ligações químicas formadas, avaliação da capacidade de biomineralização *in vitro* em fluido fisiológico simulado (SBF) e testes de resistência mecânica à tração.

1.3. Estrutura da tese

O documento está organizado em seis capítulos. O Capítulo 1 inclui um enquadramento do tema a ser desenvolvido e resume os principais objetivos almejados. No Capítulo 2 é apresentada uma revisão da literatura, onde se explica a importância do tema de trabalho, o que já foi feito e investigado, e o que pode ser eventualmente melhorado. O Capítulo 3 descreve o procedimento experimental implementado no decorrer do trabalho. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos ao longo da tese e sua discussão. No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões que podem retirar-se dos resultados atingidos e da aprendizagem adquirida, e são propostas ideias para trabalho futuro. Por último, o Capítulo 6 apresenta a bibliografia requisitada para desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Patogenia da infecção bacteriana

As doenças infecciosas continuam a ser a principal causa de morte a nível mundial, afetando todas as faixas etárias da população. Não é apenas o surgimento de novas espécies infecciosas que preocupa e que coloca em risco a saúde pública. A reincidência de infeções já previamente combatidas e o aumento da resistência dos agentes patogénicos aos fármacos utilizados, são fatores que resultam na constante procura de soluções por parte das mais variadas equipas de investigação biomédica direcionada a este ramo. Estes microrganismos possuem capacidades incríveis e cada vez mais "inovadoras" de aderirem, invadirem e causarem danos em células e tecidos do organismo saudável, sendo também cada vez mais eficazes na sobrevivência e adaptação às defesas proporcionadas pelo sistema imunitário do hospedeiro, o que origina estados infecciosos difíceis de controlar e tratar⁶.

Nas bactérias, as características da cápsula e parede celular, e os compostos libertados pelas mesmas levam a que a resposta do hospedeiro seja moldada. A cápsula é um revestimento formado pelas bactérias, através da sobreprodução e secreção de uma enorme quantidade de polissacáridos de elevado peso molecular, designados de exopolissacáridos. As mais variadas espécies bactericidas utilizam diferentes tipos de exopolissacáridos para produzirem as suas cápsulas, conferindo estas uma enorme proteção para as bactérias, tanto contra a resposta natural do hospedeiro, como contra os antibióticos que são administrados. As cápsulas bacterianas podem também levar ao agravamento da resposta inflamatória. A proteção das bactérias contra a fagocitose advém da capacidade inerente à cápsula de evitar que as opsoninas (que proporcionam a ligação célula-alvo/fagócito) sejam reconhecidas pelas células fagocitárias. Tal facto origina a "fagocitose frustrada" por parte destas células de defesa, que se baseia na elevada produção de citosinas e de outras moléculas que regulam a resposta inflamatória para o meio, numa tentativa de eliminar o invasor. Este aumento da resposta inflamatória leva a que o tecido em questão seja progressivamente danificado à medida que mais macrófagos, neutrófilos, e outras células são recrutadas para o local^{7,8}. Quanto à parede celular bacteriana, as diferenças observadas na sua estrutura levam à divisão das bactérias em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os componentes tóxicos presentes nas paredes destes microrganismos são potencialmente virulentos e desempenham um papel central na patogenicidade do choque séptico ou septicemia, infeção que afeta todo o

sistema imunológico, desencadeando uma reação em cadeia que pode provocar uma inflamação descontrolada no organismo. Esta resposta de todo o organismo à infecção produz mudanças de temperatura, da pressão arterial, frequência cardíaca, respiração e muito mais, que podem levar à falência dos órgãos. Outro dos aspetos que determina a patogenicidade dos microrganismos é a sua adesão nas superfícies hospedeiras. Estas incluem a pele, membranas mucosas (cavidade oral, nasofaringe, trato urogenital), e tecidos mais profundos (tecido linfóide, gástrico e epitélio intestinal, tecido endotelial). Cada estrutura de um organismo saudável possui mecanismos naturais bastante eficientes que visam a eliminação dos agentes patogénicos, como a secreção salivar, tosse, espirros, etc. Contudo, os microrganismos, uma vez "ligados" a uma superfície específica do hospedeiro através da produção de adesinas, principalmente em situações de carência imunitária, levam a que estes mecanismos de defesa sejam insuficientes, oferecendo assim às bactérias o meio ideal para iniciarem todo um processo bioquímico que irá resultar em doença. Deste modo, sucedida a adesão entre o microrganismo e o hospedeiro, alguns destes agentes patogénicos possuem as competências necessárias para invadirem as células-alvo. Várias são as enzimas libertadas para o meio extracelular com a finalidade de degradarem os tecidos do hospedeiro, como a hialuronidase, lipase, nuclease, collagenases⁹, entre outras. Após a entrada nas células-alvo, através da fagocitose natural, ou pela expressão de moléculas sinal produzidas pelas bactérias para induzir a sua internalização pelos fagócitos, alguns destes microrganismos conseguem sobreviver e replicar-se dentro do hospedeiro, alterando a natureza e mecanismos de ação dessas células. Por vezes, as infeções que envolvem invasão intracelular podem durar anos, requerendo assim um prolongado tratamento com antibióticos. A **Figura 1** apresenta de forma esquemática e resumida os mecanismos de patogenicidade das bactérias^{7,10,11}.

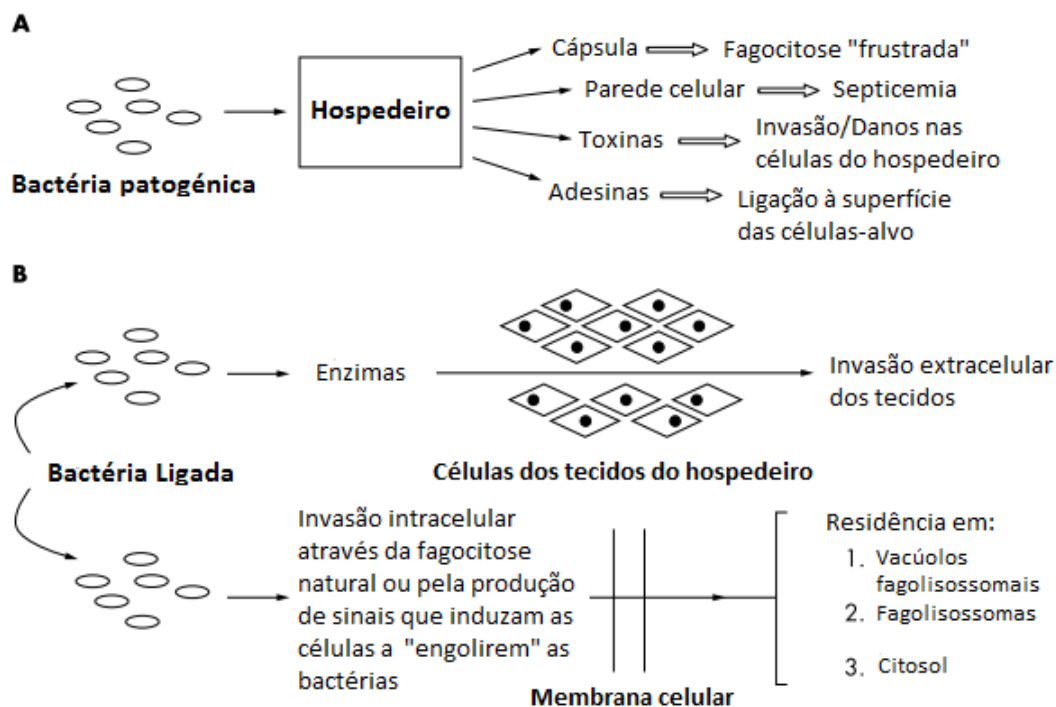


Figura 1 – Mecanismos de patogenicidade das bactérias. (A) Mecanismos que levam à ligação entre a bactéria e a célula-alvo, e (B) processo invasivo após a ligação efetuada (Adaptado de [7]).

A descoberta dos antibióticos veio revolucionar o tratamento médico das doenças infecciosas. Contudo, a vasta utilização destes fármacos tem levado ao desenvolvimento dos mais variados mecanismos de resistência a antibióticos por parte das bactérias. Tal facto fica também agravado aquando da formação de biofilmes, colónias organizadas de microrganismos que permitem o aumento da resistência às ameaças externas. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde, mais de 80% das infeções bacterianas que afetam a população envolvem a formação de biofilmes. Algumas patologias humanas comuns, tais como o desenvolvimento de cáries dentárias e periodontites, são causadas pela formação de biofilmes bacterianos. Estas colónias estão também envolvidas em infeções teciduais persistentes, tais como em feridas e otites crónicas, infeções no trato urinário e respiratório, entre outras. A sua incidência é também significativa no que diz respeito aos dispositivos médicos, tais como cateteres, *stents*, implantes ortopédicos, lentes de contacto e dispositivos eletrónicos implantáveis¹².

A formação de um biofilme encontra-se esquematicamente representada na **Figura 2**^{12,13}.

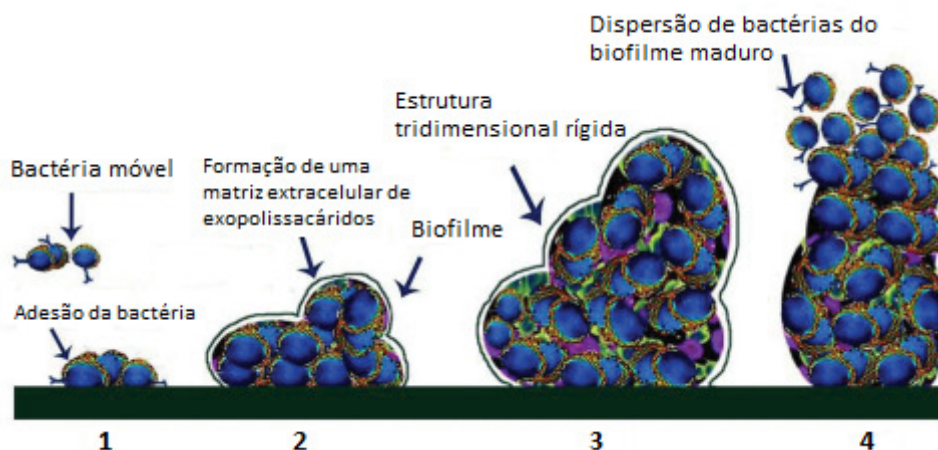


Figura 2 – Formação de um biofilme bacteriano (Adaptado de [13]).

Inicialmente, uma célula patogénica aproxima-se de determinada superfície do hospedeiro e liga-se à mesma reversivelmente. As forças gravitacionais, movimento Browniano (movimento aleatório das bactérias suspensas num fluido, resultante da sua colisão com átomos acelerados), forças hidrodinâmicas, e o movimento natural das bactérias proporcionado pelos flagelos que algumas delas possuem, são fatores que podem estar na origem da aproximação entre a bactéria e a superfície. De seguida, através da produção de uma matriz extracelular por parte da colónia de microrganismos que entretanto se agrupou, a ligação à superfície torna-se irreversível. É de salientar que o desenvolvimento das ligações reversíveis e irreversíveis é altamente dependente das características topográficas e químicas da superfície em questão¹⁴. Após a formação de uma estrutura tridimensionalmente rígida, as bactérias podem-se desintegrar ativamente do biofilme ou então serem arrastadas por alguma ação mecânica externa (imaginemos uma limpeza dentária)¹².

Os biofilmes possuem mecanismos extraordinários de proteção contra antibióticos e contra o sistema imunitário, de entre os quais: (i) a formação da matriz tridimensional rígida que permite proteger as camadas mais profundas do biofilme, dificultando a eficácia dos agentes terapêuticos (nomeadamente, os antibióticos) ou das células defensoras do hospedeiro; (ii) criação de uma barreira electrostaticamente repulsiva, ou que possua a capacidade de sequestrar substâncias antibacterianas, de modo a que internamente sejam eliminadas; (iii) aquisição de um metabolismo lento, o que torna o biofilme insensitivo às concentrações utilizadas de antibiótico; (iv) expressão de fatores de virulência e (v) desenvolvimento de estirpes altamente resistentes aos fármacos. Estas estirpes podem ser

desenvolvidas através da elevada transferência horizontal de genes na comunidade bacteriana que compõe o biofilme. Este processo permite que uma bactéria sem resistência a agentes antibacterianos adquira de outra bactéria (da mesma espécie ou de espécie diferente) genes que garantem tal resistência^{7,15}.

Vários têm sido os métodos investigados e alguns já aplicados no sentido de tratar, evitar e prevenir o desenvolvimento de biofilmes patogênicos. Alguns deles incluem o desenvolvimento de superfícies antibacterianas com propriedades físicas, químicas e topográficas anti adesivas para as bactérias, ou ainda, que possuam propriedades bactericidas ou bacteriostáticas. Outras estratégias passam pela introdução de compostos bioquímicos que inibam a produção de toxinas e adesinas pelos microrganismos, entre outras soluções¹².

2.2. Biomateriais

A perda de um órgão ou de alguma parte do corpo gera, além da privação da sua função, distúrbios sociais e psicológicos que podem deixar marcas para toda a vida¹⁶. A necessidade de resolver os problemas relacionados com a reconstrução de tecidos e órgãos danificados por acidentes, doenças, quedas, ou apenas pelo inevitável envelhecimento, impulsionou a introdução dos materiais nas ciências da saúde. Com os avanços tecnológicos, os biomateriais e dispositivos médicos têm vindo a ser aplicados nos mais variados ramos da medicina, tais como em ortopedia, oftalmologia, cardiologia, dermatologia, entre outros. A ciência dos biomateriais engloba tanto a terapêutica como o diagnóstico, e abrange vários ramos da ciência, como as ciências básicas que incluem a física, química e biologia, envolvendo também diferentes áreas da engenharia e medicina. As etapas requeridas para a utilização de um biomaterial na prática médica são: pesquisa científica de biomateriais aplicáveis para determinada situação clínica específica; desenvolvimento do dispositivo médico; testes *in vitro*, em animais e em seres humanos; aprovação regulamentar do dispositivo; e, por fim, produção, comercialização e aplicação na prática clínica¹⁷.

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde, um biomaterial pode ser entendido como sendo qualquer substância ou combinação de substâncias, à exceção das drogas de origem natural ou sintética, que pode ser utilizado por um período de tempo indefinido, e com a finalidade de substituir parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função

biológica para que seja mantida ou ainda melhorada a qualidade de vida de determinado indivíduo¹⁶. Estes podem ser divididos em três principais tipos de materiais: metálicos, baseados em ligações metálicas; cerâmicos, formados por ligações iônicas; e polímeros, à base de ligações covalentes. Além destes existem ainda os materiais híbridos, usualmente designados de compósitos, que combinam os diferentes tipos de materiais de modo a que se tome vantagem das qualidades dos mesmos, e se elimine ou, pelo menos, atenuem os defeitos de cada um¹⁸.

O desenvolvimento dos biomateriais tem vindo a evoluir ao longo de três gerações distintas. A primeira geração de biomateriais (que teve início por volta dos anos 1950) ficou caracterizada pela aplicação médica de materiais que eram utilizados na indústria recorrente, mas que não foram desenvolvidos especificamente para o uso clínico. A seleção dos biomateriais a serem utilizados envolvia a escolha daqueles que apresentavam as propriedades mais adequadas para cada caso específico, combinando com a resposta mínima que deveriam provocar no organismo. Este tipo de reação mínima, ou mesmo nula, classifica os biomateriais como sendo quase-inertes ou inertes, respetivamente, o que na altura correspondia a dizer que eram biocompatíveis¹⁷. Ser biocompatível corresponde à capacidade de um biomaterial desempenhar determinada função desejada em relação a uma terapia médica, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistémicos indesejáveis no beneficiário da referida terapia. Exemplos de biomateriais de 1ª geração implementados incluem a borracha de silicone utilizada na substituição da articulação dos dedos, o aço inoxidável para desenvolvimento de hastes femorais, entre outros¹⁶. Os biomateriais de segunda geração evoluíram a partir dos inicialmente utilizados, diferenciando dos mesmos no sentido da procura por reações e interações tecido-biomaterial controladas, de modo a que o efeito terapêutico fosse melhorado¹⁷. Esta interação foi definida como bioativa, sendo os biomateriais bioativos aqueles que não provocam reações tóxicas por parte dos tecidos, e que ao mesmo tempo são biologicamente ativos, induzindo a formação de uma ligação na interface biomaterial-tecido¹⁶. Em 1980 estes materiais começaram a ser utilizados em cirurgias ortopédicas e dentárias, na libertação controlada de fármacos, em dispositivos eletrónicos implantáveis, e muito mais. Também nesta fase foram introduzidos na medicina os materiais reabsorvíveis, ou seja, aqueles que possuem taxas de degradação adequadas para os requisitos de determinada aplicação. Por último, os biomateriais de terceira geração desempenham um papel essencial no desenvolvimento e evolução

exponencial das áreas da medicina regenerativa e engenharia dos tecidos. Estas fazem uso de células vivas na formação ou regeneração de tecidos vivos, permitindo a recuperação de estruturas danificadas do organismo¹⁷.

2.2.1. Biomateriais anti-infeciosos

A utilização de biomateriais com propriedades anti-infeciosas tem vindo progressivamente a tornar-se uma estratégia primária de prevenção de infeções associadas a dispositivos médicos externos e parcialmente ou totalmente internos (**Figura 3**)¹⁹.

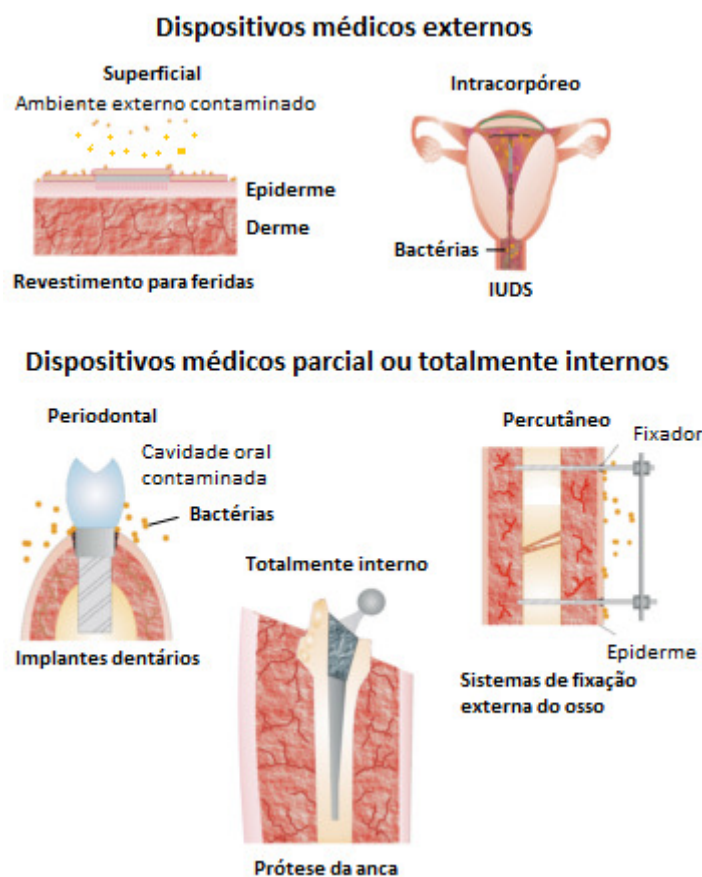


Figura 3 – Dispositivos médicos externos e internos (Adaptado de [19]).

Nos dispositivos médicos externos, destacam-se por exemplo os revestimentos utilizados em feridas superficiais¹⁹. A pele é o órgão mais exposto ao meio ambiente, sendo colonizada por várias populações diferentes de microrganismos, que na sua maioria são bactérias. Estas, em pequenas quantidades colonizam diferentes camadas da arquitetura da pele, isto é, na epiderme, derme, tecido subcutâneo e tecido adiposo, e na fáscia

muscular. Quando existe uma ruptura na barreira tegumentar, o número de bactérias aumenta nesse local, o que resulta frequentemente em infecção¹⁰. Assim, quando desses acontecimentos, torna-se crucial a utilização de pensos ou qualquer outro revestimento à base de um ou mais biomateriais com propriedades antibacterianas. Outro exemplo de infecções associadas a dispositivos médicos externos são aquelas desencadeadas pela utilização de lentes de contacto. O desgaste provocado pelas lentes de contacto pode alterar o equilíbrio existente entre a flora normal ocular e as defesas do hospedeiro, alterando a homeostasia dos tecidos oculares e induzindo diversos transtornos fisiológicos que afetam a resistência do hospedeiro à infecção. Nesses casos, sendo corpos estranhos ao organismo, as lentes de contato apresentam-se como um suporte físico ideal para a adesão e colonização bacteriana. Uma série de efeitos adversos estão associados ao uso de lentes de contato. Estes incluem ceratite microbiana, ceratite infiltrativa, úlceras periféricas, etc. Os cateteres, dispositivos de contraceção intrauterinos (do inglês *intrauterine devices*, IUDs), entre outros, são exemplos de sistemas que pertencem também ao grupo dos dispositivos médicos externos¹⁹.

Os dispositivos internos podem corresponder a dispositivos periodontais, percutâneos e a dispositivos totalmente internos. De entre os periodontais destacam-se os implantes dentários. O número de implantes dentários colocados tem vindo a aumentar exponencialmente, o que significa que também cada vez mais são os casos de doenças peri-implantares. Dentro destas existem dois tipos: mucosite peri-implantar ou peri-implantite. A primeira caracteriza-se pela inflamação e ulceração dos tecidos moles que envolvem o implante, sendo uma resposta hostil aos microrganismos patogénicos periodontais, e manifesta-se através de vermelhidão, inchaço e/ou sangramento. A peri-implantite é um processo inflamatório destrutivo mais grave que afeta tanto o tecido mole como o tecido rígido ao redor de um implante dentário, e que pode em alguns casos levar à perda de osso. A cavidade bucal é um local de contacto quase constante com agentes externos patogénicos, e, portanto, é de maior importância a proteção antibacteriana dos implantes que aí sejam colocados. Contudo, não significa que os dispositivos totalmente internos não sejam também alvo de proliferação bacteriana. A incorreta esterilização de uma prótese da anca (por exemplo) implantada e dos materiais utilizados na cirurgia, a migração dos microrganismos presentes na ferida cirúrgica para o local da prótese já instalada, e muitos outros fatores, podem causar graves consequências, tais como a

necessidade de remoção total da prótese, com o inerente aumento da morbidade do paciente e dos custos hospitalares associados. Também a disseminação descontrolada de resistência microbiana aos antibióticos torna urgente a busca de soluções alternativas ao controlo das infeções associadas a dispositivos médicos¹⁹.

Assim, torna-se evidente a necessidade de biomateriais antibacterianos que sirvam de revestimento dos dispositivos médicos, ou ainda, que representem parte integral dos mesmos. Estes biomateriais podem possuir não só tais funções, como também desempenhar um papel crucial na entrega controlada de fármacos antimicrobianos. Neste sentido, várias têm sido as formulações de biomateriais investigadas e testadas. Estas incluem a implementação de biomateriais anti adesivos e repelentes aos microrganismos em superfícies, a utilização de biomateriais intrinsecamente bioativos com propriedades antibacterianas, biomateriais com características ótimas na entrega controlada de agentes antibacterianos, entre outros³. Os materiais que exibem ação antibacteriana sem que haja introdução de substâncias antimicrobianas na sua estrutura ou o seu revestimento com moléculas funcionalmente ativas, são considerados intrínseca e bioativamente antibacterianos. Na sua maioria correspondem aos metais, como a prata, cobre e zinco, alguns polímeros, e vários vidros bioativos³. Apesar da eficácia antimicrobiana inerente aos metais, a toxicidade que provocam no organismo é de maior importância e tem sido alvo de uma vasta gama de estudos. A prata, por exemplo, é dos metais mais investigados em aplicações antibacterianas, porém, apesar do seu enorme potencial nesse sentido, também possui desvantagens inerentes à toxicidade que provoca nos tecidos. De modo a contornar este problema, que é evidente não só para prata como também para outros metais, a formulação de compósitos com os mesmos incorporados, especialmente na forma de micro e nanopartículas, tem vindo a diminuir a tendência citotóxica dos metais, melhorando assim a sua biocompatibilidade²⁰. Por sua vez, além de ser aumentada a biocompatibilidade dos pós metálicos aquando da sua adição a outros biomateriais, também tais biomateriais beneficiam com as propriedades antibacterianas proporcionadas pelas partículas metálicas³.

2.3. Quitosano

A história do QS remonta ao século XIX quando Rouget procedeu ao estudo das formas desacetiladas do polímero natural quitina em 1859. Durante os últimos anos tem sido relatada uma quantidade substancial de investigações e estudos realizados sobre o QS e seus derivados, e seu potencial uso em várias bio-aplicações²¹. Este polímero, também conhecido como quitina desacetilada, é um polissacárido linear natural semi-cristalino derivado da desacetilação parcial da quitina. Esta constitui um dos elementos estruturais principais do exosqueleto de insetos, crustáceos (maioritariamente camarões e caranguejos) e paredes celulares de fungos, sendo o segundo polissacárido natural mais abundante a seguir à celulose. É formada por unidades N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) e D-glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, conforme apresentado na **Figura 4**^{22,23}.

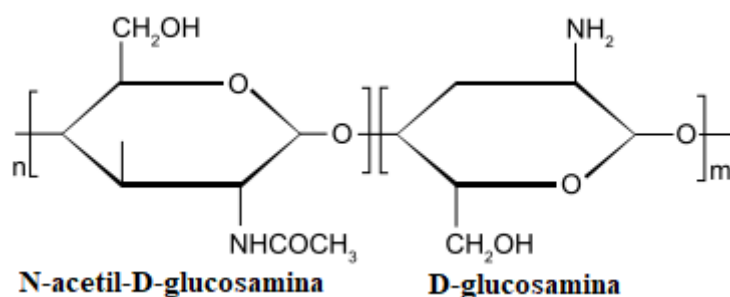


Figura 4 – Estrutura da quitina desacetilada (Adaptado de [24]).

O processo de desacetilação da quitina envolve a hidrólise dos grupos acetamido das porções N-acetil-D-glucosamina, o que resulta na conversão destas unidades em D-glucosamina com grupos amina livres ($-\text{NH}_2$). O grau médio de acetilação (\overline{GA}) é assim definido pela fração média de unidades N-acetil-D-glucosamina presentes no polímero, sendo o grau médio de desacetilação (\overline{GD}) correspondente à fração média de unidades D-glucosamina existentes²³. Para um \overline{GA} inferior a 50% a quitina apresenta solubilidade em meios ácidos ($\text{pH} < 6$), passando assim a ser designada de QS. Esta solubilidade resulta da existência de uma quantidade suficiente de grupos amina, onde, através da sua protonação, são geradas cargas positivas ($-\text{NH}_3^+$) que conferem capacidades electrostáticas entre as cadeias poliméricas do QS, tornando-o assim um composto catiónico solúvel.

Contrariamente, quando o pH aumenta para valores alcalinos, os grupos amina da porção D-glucosamina do QS sofrem desprotonação e o polímero perde a sua carga tornando-se insolúvel. Assim, a solubilidade do QS em meios de acidez moderada está diretamente relacionada com o \overline{GD} , ou seja, com a quantidade de grupos amina disponíveis para protonação. A presença destes grupos, e de mais dois grupos reativos hidroxilo primário e secundário no QS, favorecem também a ocorrência de interações com outros compostos, como por exemplo moléculas, células ou outros biomateriais. Fatores como o \overline{GA} ou \overline{GD} , concentração do polímero, tamanho da cadeia, peso molecular (50 kDa – 2000 kDa)²⁵, entre outros, influenciam diretamente as propriedades químicas e biológicas do QS²⁶.

O QS tem vindo a ser um importante candidato para o largo espectro de aplicações biomédicas devido às propriedades únicas que apresenta, de entre as quais se destaca a biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inócuos, não-toxicidade, capacidade antibacteriana e antifúngica, etc.²⁷. A possibilidade de moldar este biopolímero nas mais variadas formas, como em filmes de revestimento, pós, hidrogéis, fibras e *scaffolds*, tem vindo a permitir a sua utilização na engenharia dos tecidos ósseos, sistemas de libertação controlada de fármacos, revestimentos para feridas, e muitas outras aplicações²². No que diz respeito à biodegradação, o QS pode ser degradado química ou enzimaticamente resultando em fragmentos possíveis de serem eliminados pelas vias naturais de excreção do nosso organismo. A degradação química do QS é verificada em alguns meios ácidos, meio esse que se encontra, por exemplo, no estômago. Por sua vez, a degradação enzimática ocorre aquando da quebra das ligações glicosídicas presentes no QS, resultando na formação de oligossacáridos não tóxicos. Nos vertebrados, o QS é predominantemente degradado pela enzima lisozima²⁸. Quanto à ação antibacteriana, o QS pode ser considerado como um agente bactericida quando induz a morte celular total ou parcial das bactérias, ou como um agente bacteriostático, quando dificulta o crescimento das bactérias não atuando em primeiro plano na sua morte. Existem dois mecanismos principais que podem explicar a ação antibacteriana do QS. O primeiro está relacionado com as interações electrostáticas existentes entre os grupos protonados $-NH_3^+$ do QS e os resíduos negativos das bactérias. Tais interações promovem alterações na permeabilidade da membrana celular, provocando assim desequilíbrios osmóticos internos que resultam na inibição do crescimento dos microrganismos. Por outro lado, podem também desencadear a lise da parede celular bacteriana através da hidrólise dos peptidoglicanos presentes na mesma, o

que leva a que alguns eletrólitos intracelulares, como iões potássio, e outros constituintes de baixo peso molecular, como proteínas e ácidos nucleicos, possam escapar e conduzir os agentes patogénicos à morte celular. O segundo mecanismo proposto na literatura está relacionado com a ligação entre os grupos protonados do QS com o ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano que pode conduzir à inibição da síntese do ácido ribonucleico mensageiro (mARN) fundamental para o crescimento e proliferação celular^{23,26,29}.

2.3.1. Produção

A produção do QS pode ser dividida em duas fases principais, sendo a primeira a extração da quitina do exosqueleto dos crustáceos, e a segunda a sua transformação em QS. Primeiramente, as cascas de tamanho idêntico e pertencentes a determinada espécie são agrupadas, seguidamente limpas, secas e trituradas, e por fim purificadas. Não existe um método de purificação padrão, uma vez que diferentes fontes de quitina requerem diferentes tratamentos devido à diversidade das suas estruturas. Convencionalmente, o protocolo é dividido em etapas de desmineralização, desproteinização e descoloração, que podem ser realizadas utilizando tratamentos químicos ou biológicos (fermentação ou tratamento enzimático). Para aplicação biomédica ou farmacêutica, o produto final desta fase deverá ser altamente limpo no que diz respeito a proteínas, minerais e pigmentos, pois estes compostos podem desencadear efeitos secundários graves na saúde pública. Na segunda fase do processo dá-se a conversão da quitina em QS, que pode ser efetuada pela desacetilação enzimática ou microbiológica, através de enzimas ou microrganismos, respetivamente, ou pela desacetilação química. Esta última é mais utilizada para preparação comercial devido aos custos económicos e viabilidade para produção em massa²². Por esta via, o QS é obtido pelo tratamento térmico da quitina em solução alcalina, como por exemplo em hidróxido de sódio (NaOH), durante determinado período de tempo²⁶.

2.3.2. Membranas de quitosano

O processamento de membranas poliméricas pode ser realizado de várias formas distintas, estando a escolha do método a utilizar dependente do polímero escolhido para o desenvolvimento da membrana, da finalidade da mesma, dos custos associados à técnica, e

das propriedades morfológicas pretendidas. As técnicas comumente utilizadas incluem a inversão de fases, polimerização interfacial, *electrospinning*, entre outras. A inversão de fases pode ser descrita como sendo o processo pelo qual uma solução líquida inicial se transforma, de forma controlada, numa estrutura sólida. Esta transformação pode ser alcançada de várias formas, como por exemplo, através da evaporação do solvente. Este último método, do inglês *solvent casting method*, tendo em conta a sua simplicidade e eficácia na produção de filmes poliméricos será o método escolhido no presente estudo para o desenvolvimento das membranas de QS. Como o próprio nome da técnica indica, baseia-se na obtenção de uma membrana após remoção, por evaporação, do solvente utilizado na preparação da solução polimérica inicial. Esta evaporação pode ser facilitada aquando induzida termicamente, ou seja, através da colocação da solução polimérica num meio com temperatura superior à temperatura ambiente, adequada ao tipo de polímero em questão³⁰.

Um aspeto crucial a ter em atenção no processamento de filmes de QS para aplicações biomédicas é a neutralização. O QS, como dito anteriormente, é um biopolímero que apresenta solubilidade limitada a soluções ácidas, como por exemplo soluções de ácido acético, ácido fórmico, ácido clorídrico, etc. Assim, o QS dissolvido neste tipo de meios leva a que a solução resultante apresente valores de pH ácidos²⁸. Tal facto origina a necessidade de neutralização do QS com uma base, para que as cargas positivas sejam neutralizadas e assim nenhuma reação indesejada advenha por parte do nosso organismo aquando em contacto com este biomaterial. Para além de ser um passo indispensável no que respeita à biocompatibilidade, em termos estruturais a neutralização desempenha um papel fundamental. Os grupos amina protonados em pH ácido aumentam a hidrofilicidade das membranas de QS, conferindo-lhe assim uma excessiva capacidade de "inchamento" em contacto com água. Esta afinidade para a água, que é minimizada quando as cargas protonadas são neutralizadas, poderia mesmo levar à perda da integridade da membrana, sendo também um enorme problema para aplicações que requerem uma controlada libertação de compostos terapêuticos. Neste último caso, em contacto com fluidos fisiológicos, o QS não neutralizado iria libertar de forma rápida e descontrolada o composto que incorporava³¹. Deste modo, neutralizar o QS torna-se de maior pertinência de modo a que todos estes inconvenientes sejam evitados.

2.4. Biocompósitos à base de quitosano

Várias combinações de biomateriais contendo o QS na formulação têm sido desenvolvidas. Estes biocompósitos possuem a função principal de preencher as lacunas e desvantagens de cada material individualmente, bem como potenciar os pontos positivos de cada um. Por exemplo, uma das principais finalidades da junção do QS a outros polímeros, naturais ou sintéticos (como por exemplo o PEG), é melhorar as propriedades mecânicas do QS, de modo a que este se torne mais flexível e moldável. A formação de complexos com materiais cerâmicos, por sua vez, tem como objetivo primordial oferecer propriedades osteoindutoras e osteocondutoras ao compósito para que este seja capaz de promover a regeneração de tecidos ósseos. Por último, graças às aptidões contra os agentes patogénicos, à necessidade de serem estabilizados com outros biomateriais, e pela carência de biocompatibilidade no organismo, os metais têm vindo a ser amplamente complexados com polímeros, de entre os quais se destaca o QS²⁶.

2.4.1. Quitosano/polietilenoglicol

A estrutura cristalina do QS é estabilizada por ligações intramoleculares e intermoleculares, sendo os grupos acetamido responsáveis pela formação de ligações de segunda ordem entre as cadeias adjacentes do polímero. Esta estrutura tridimensionalmente rígida leva a que as membranas formuladas unicamente pelo QS sejam frágeis e quebradiças. Deste modo, torna-se essencial utilizar plastificantes, como por exemplo, o PEG, glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, entre outros³², que proporcionem melhores propriedades mecânicas às membranas de QS³³.

O PEG é um poliéster que pode apresentar a configuração linear ou ramificada, com terminações baseadas em grupos hidroxilo, e que possui a estrutura generalizada apresentada na **Figura 5**³⁴.

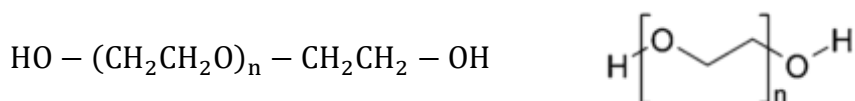


Figura 5 – Estrutura do PEG (Adaptado de [34] e [35]).

A síntese deste biopolímero é realizada através da polimerização, preferencialmente aniônica, do óxido de etileno³⁴. É um polímero sintético aprovado pela *Food and Drug Administration*, FDA, para consumo interno e para pertença em vastas variedades de alimentos, cosméticos e sistemas de entrega de fármacos³⁶. Para além dessa aprovação, as suas propriedades hidrofílicas, plastificantes, biocompatíveis, não-tóxicas, não-imunogénicas e não-inflamatórias tornam este material ótimo para formular compósitos membranosos com o QS³⁷.

Sendo o PEG um plastificante, é necessário compreender o modo de atuação do mesmo na estrutura do QS. Os plastificantes são aditivos utilizados para aumentar a flexibilidade ou plasticidade de alguns polímeros, sendo ocasionalmente utilizados apenas para processamento dos mesmos. Algumas teorias têm vindo a ser propostas quanto ao mecanismo de plastificação. A teoria da lubrificação postula que os plastificantes atuam como lubrificantes internos que reduzem as forças friccionais entre as cadeias poliméricas do composto a ser plastificado. A teoria do gel afirma que a rigidez do polímero provém da sua estrutura tridimensionalmente organizada, sendo a quebra das interações existentes entre as cadeias poliméricas (por exemplo, ligações de hidrogénio e van der Waals ou forças iónicas) o principal modo de atuação de um plastificante. Por último, a teoria do volume livre atribui à plastificação a função de induzir o aumento dos espaços (volume) livres dentro do polímero. Os plastificantes ideais devem ser miscíveis e compatíveis em todas as proporções utilizadas com o polímero a ser beneficiado³². De acordo com o que se encontra proposto na literatura, o PEG plastifica a organizada estrutura do QS através da destruição de algumas das suas ligações intermoleculares e/ou secundárias, promovendo em seu lugar o desenvolvimento de novas ligações entre os dois polímeros. Assim, o composto polimérico formado beneficia com uma maior mobilidade das suas cadeias, apresentando, portanto, melhores propriedades mecânicas³³.

Melhorar a flexibilidade das membranas de QS é a principal finalidade da adição do PEG. No entanto, outro motivo pelo qual se utiliza este biopolímero é o facto de o mesmo proporcionar características hidrofílicas moderadas à membrana de QS, aumentando assim razoavelmente a sua afinidade para a água. Deste modo, aquando da introdução da membrana internamente no organismo, os domínios hidrofílicos do PEG irão permitir a entrada de água e fluidos fisiológicos na rede polimérica³⁸. O equilibrado teor em fluidos fisiológicos que se gera na membrana torna o ambiente propício para, por exemplo, se

desencadear uma atividade imunológica essencial para o processo de cicatrização de feridas. No entanto, as bactérias também são atraídas pela humidade do meio, o que pode resultar no desenvolvimento de infeções através da formação de biofilmes patogénicos. Logo, torna-se essencial que a membrana contenha materiais na sua composição que possuam propriedades antibacterianas intrínsecas, e/ou que transportem fármacos antibacterianos. Para o primeiro caso, a incorporação de micro e nanopartículas metálicas torna-se uma mais-valia para a eficácia antibacteriana das membranas^{2,39}.

2.4.2. Quitosano/fosfatos de cálcio

Quando se procede à colocação de um dispositivo médico implantável no organismo é essencial ter em conta que a superfície do mesmo é o primeiro local de contacto entre o dispositivo e o organismo hospedeiro. Torna-se assim evidente a importância de revestir a superfície destes implantes com biomateriais que favoreçam a interação biocompatível entre o implante e os tecidos envolventes. Deste modo, o material de revestimento utilizado deverá possuir propriedades biocompatíveis, angiogénicas e osteocondutoras (no caso de dispositivos médicos concebidos para a parte óssea) que promovam o sucesso do dispositivo implantado⁴⁰. Para o desenvolvimento de materiais de auxílio à regeneração de tecidos ósseos, é crucial que os mesmos sejam inspirados na arquitetura do osso natural. O osso possui uma complexa estrutura compósita baseada em material orgânico e inorgânico. A porção orgânica é composta principalmente por colagénio tipo I, sendo a porção inorgânica constituída maioritariamente por cristais de um tipo de CaP, a hidroxiapatite (HAp). Os CaPs são, portanto, os biomateriais que mais têm atraído interesse na engenharia de tecidos ósseos onde a biocompatibilidade e bioatividade são qualidades essenciais, podendo estes ser utilizados como revestimentos de implantes, *scaffolds* de substituição óssea, entre outras formas possíveis⁴¹.

Ao serem implantados no organismo, a progressiva dissolução dos CaPs em meio fisiológico aumenta a concentração localizada de iões cálcio e fósforo. A deposição destes iões na superfície do material favorece a formação de uma camada de apatite. Este revestimento de apatite, por sua vez, promove a adesão de células precursoras osteogénicas que aí se agregam, proliferam, e se diferenciam, produzindo matriz óssea com formação de novo osso. Todo este processo de interação entre o implante e o tecido envolvente encontra-se ilustrado na **Figura 6**⁴⁰.

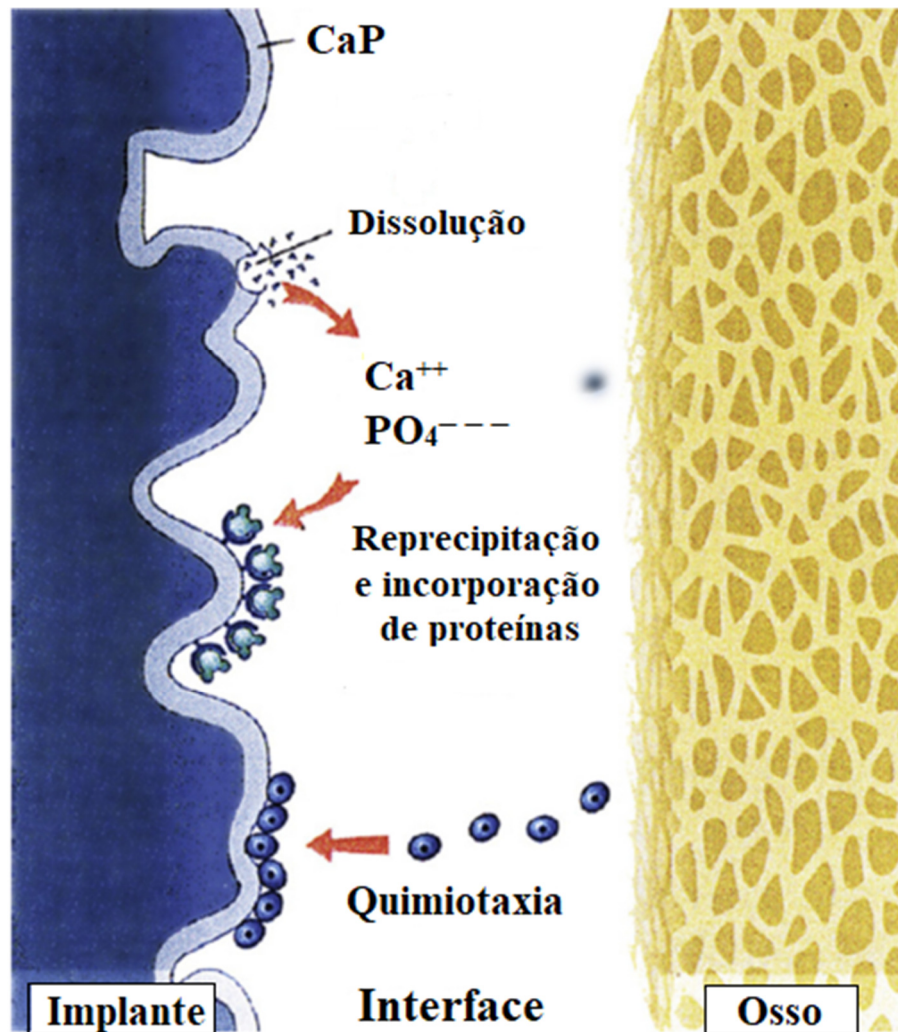


Figura 6 – Ilustração da osteocondução promovida por um material à base de CaP (Adaptado de [40]).

Torna-se assim evidente a razão pela qual os CaPs se encontram na linha da frente no ramo da engenharia dos tecidos ósseos⁴².

A classificação dos diferentes tipos de CaPs é feita através da razão entre cálcio e fósforo (Ca/P) que os mesmos apresentam. A **Tabela 1** apresenta algumas características dos CaPs mais utilizados na indústria biomédica⁴³.

Tabela 1 – Características dos CaP mais utilizados na indústria biomédica (Adaptado de [43]).

Nome	Fórmula química	Razão Ca/P
Fosfato dicálcico	CaHPO_4	1,00
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00

De entre os CaPs apresentados, a HAp e o fosfato tricálcico (TCP) têm sido os biocerâmicos mais investigados para regeneração óssea. Tal facto deve-se a um aspeto crucial que dita o comportamento de um material à base de CaP no organismo, a solubilidade. O valor de solubilidade deverá ser tal que permita que o material não seja degradado antes de ocorrer uma suficiente formação óssea no local onde o mesmo é implantado, permitindo assim que o material atue como suporte mecânico para a migração, fixação e proliferação de células ósseas. Por outro lado, a taxa de degradação não deverá ser demasiado lenta, pois dessa forma o material atuaria como uma barreira à continuação do processo natural de regeneração óssea⁴⁴. A solubilidade dos CaPs aumenta à medida que a razão Ca/P diminui. Assim, é possível deduzir que entre os principais CaPs, a HAp é a forma mais estável e menos biodegradável, sendo o TCP a forma mais solúvel. O TCP apresenta ainda duas fases distintas comumente utilizadas, α e β , que diferem entre si pelo tratamento térmico que é aplicado. O β -TCP é obtido com uma temperatura de calcinação entre 650 – 1125 °C. Ultrapassando o limite superior desta gama de valores, seguido de arrefecimento brusco, é atingida a fase α -TCP que é menos estável que a fase β ⁴⁵. A taxa de biodegradação destes CaPs pode ser, portanto, apresentada de forma decrescente do seguinte modo⁴⁶:

$$\alpha\text{-TCP} > \beta\text{-TCP} > \text{HAp}$$

Apesar da HAp e do β -TCP serem as formas mais importantes na biomedicina, as taxas de degradação extremas de ambos tornam-se uma limitação para a sua implementação individual no organismo. Muitos estudos indicam que a dissolução da

HAp, após implantação no corpo humano, é demasiado reduzida para aplicações clínicas de longo prazo. Por outro lado, a dissolução do β -TCP é demasiado rápida para se criarem ligações com o tecido ósseo. Com a necessidade de se atingirem taxas de reabsorção adequadas, surgem os cerâmicos bifásicos (BCP), resultando os mesmos de uma combinação adequada de HAp com β -TCP. Deste modo, são reunidas duas fases essenciais para o sucesso do biomaterial: a fase mais solúvel dos biocerâmicos, β -TCP e a fase mais estável, a HAp. A taxa de biodegradação fica assim dependente da razão existente entre estes dois tipos de CaPs⁴⁷.

Apesar da aplicação maioritária dos CaPs em revestimentos de implantes ortopédicos, a sua utilização em feridas superficiais também tem sido investigada. Como é sabido, os biomateriais que constituem os revestimentos para feridas necessitam de promover a angiogénese de modo a que os novos vasos sanguíneos formados transportem nutrientes e oxigénio essenciais para o processo de cicatrização. Vários são os estudos científicos que relatam a capacidade dos CaPs induzirem o processo de angiogénese. A libertação de iões Ca^{2+} favorece também a regulação da homeostasia da pele, além de modular a proliferação e diferenciação de queratinócitos responsáveis pela síntese de queratina⁴⁸.

Tanto implementados como revestimentos de dispositivos médicos externos como internos, torna-se uma mais valia adicionar os cristais de CaPs em matrizes poliméricas, pois o compósito final irá beneficiar com uma biocompatibilidade reforçada e uma bioatividade ótima. Com este propósito, no presente estudo as partículas de CaP serão adicionadas às membranas de QS/PEG⁴⁹.

2.4.3. Quitosano/óxido de zinco e cobre

Como referido anteriormente, aquando do desenvolvimento de um dispositivo médico é de maior relevância ter em conta as propriedades antibacterianas que o mesmo apresenta. Os metais ou óxidos metálicos apresentam ótimas propriedades antibacterianas, e, portanto, indo de encontro ao objetivo deste trabalho, as membranas compósitas de QS/PEG/CaP serão ainda dopadas com dois tipos de óxidos metálicos, o óxido de zinco (ZnO) e óxido de cobre (CuO). De acordo com vários estudos relatados, a combinação destes materiais oferece uma maior redução do crescimento bacteriano comparativamente

àquela atingida por estes compostos isolados, sendo esta a razão pela qual se introduzem ambos os metais nas membranas^{50,51,52}.

O cobre é um agente antimicrobiano que tem vindo a ser utilizado desde há centenas de anos, na esterilização da água, esterilização de feridas, em utensílios de cozinha para prevenir a propagação de doenças, entre outras aplicações⁵³. Tal como todos os metais, o cobre pode tornar-se prejudicial à saúde aquando da sua acumulação no organismo. Contudo, ao contrário do que acontece com outros elementos metálicos, existem transportadores de cobre no corpo humano que permitem controlar da homeostasia deste material. Além das suas propriedades antimicrobianas, o cobre é também reconhecido pelo seu efeito estimulante sobre as células endoteliais, direcionando-as para a angiogénese⁵⁴. Além do cobre, o zinco é outro metal que apresenta propriedades antibacterianas ótimas, e que, por outro lado, induz a osteogénese, inibe a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e promove a cicatrização de feridas^{44,55}. Ao contrário da prata e do ouro (por exemplo), o cobre e o zinco não requerem elevados custos para a sua obtenção, e têm vindo a ser amplamente aplicados como agentes antibacterianos na forma de óxidos à escala micro e nanométrica⁵⁶.

O mecanismo pelo qual as nanopartículas metálicas apresentam a atividade antibacteriana está representado na **Figura 7**⁵⁷.

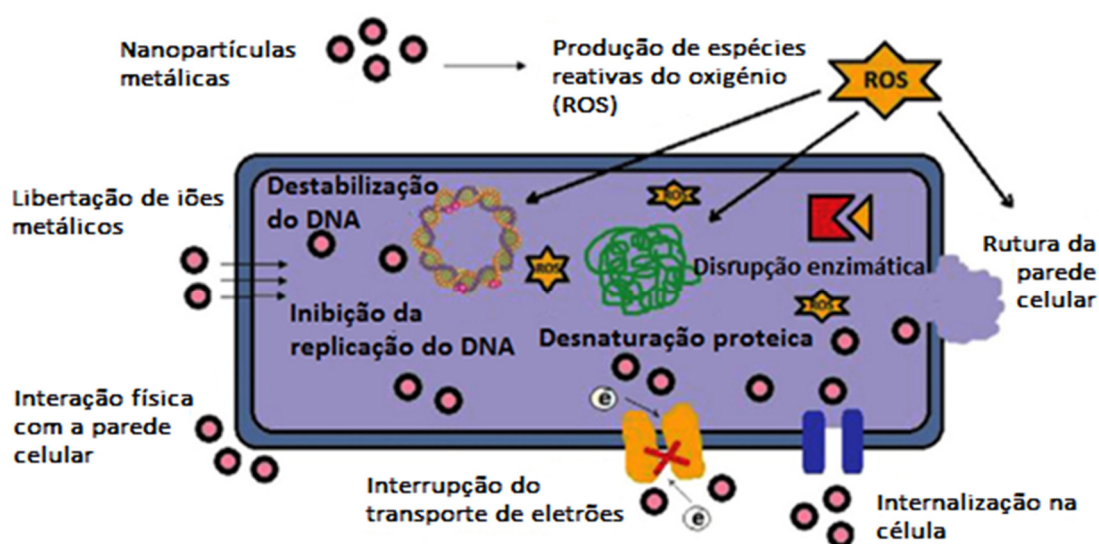


Figura 7 – Atividade antibacteriana das nanopartículas metálicas (Adaptado de [57]).

As partículas metálicas conseguem desencadear uma série de mecanismos que levam à morte das bactérias através de duas vias, sendo uma via mais direta e a outra mais indireta:

- Indiretamente, os pós metálicos possuem atividade antibacteriana através da produção de espécies reativas do oxigénio (ROS) e através da libertação de iões metálicos. As ROS formam-se nos defeitos presentes na estrutura das micro e nanopartículas como resultado de reações que envolvem oxigénio e água. Tais espécies correspondem aos aniões superóxidos (O^{2-}), peróxidos de hidrogénio (H_2O_2) e hidróxidos (OH^-). Após a sua internalização na bactéria, a toxicidade destes radicais, bem como dos iões metálicos libertados, envolve a destruição de vários componentes celulares do microrganismo, de entre os quais lípidos, ADN e proteínas⁵⁸. A libertação de iões metálicos torna-se favorecida aquando da apresentação dos óxidos metálicos na forma de nanopartículas, devido ao aumento da razão área superficial/volume. Esta libertação é também influenciada aquando da introdução das nanopartículas em matrizes poliméricas. Neste último caso, matrizes poliméricas polares, isto é, que facilitam a entrada de moléculas de água na rede, favorecem a libertação de iões metálicos das nanopartículas aí presentes, sendo potenciada assim a atividade antimicrobiana das nanopartículas metálicas⁵³;
- Através da via direta, ocorre interação física entre as nanopartículas e os microrganismos patogénicos, o que resulta na internalização das partículas metálicas na bactéria. Essa internalização pode ocorrer por endocitose ou difusão direta dependendo do tamanho das nanopartículas em questão. Quando as nanopartículas possuem tamanhos na gama dos 10–100 nm, estas atravessam a membrana pelo processo de endocitose que envolve três passos: as partículas aderem à membrana; a membrana envolve-as formando vacúolos; e, finalmente, o complexo separa-se da membrana internalizando as nanopartículas. Por sua vez, quando as partículas metálicas apresentam tamanhos inferiores a 10 nm conseguem penetrar nos microrganismos por difusão direta. Durante todo este processo invasivo, as nanopartículas vão libertando iões metálicos que ao mesmo tempo agravam o estado dos agentes patogénicos⁵³.

Existem duas formas principais de preparação de compósitos poliméricos dopados com partículas metálicas, bem como com outro tipo de micro e nanomateriais. As duas técnicas, *in situ* ou *ex situ*, podem ser distinguidas pelo meio onde as partículas são sintetizadas. Se a matriz polimérica serve como meio de reação para a produção das partículas, então estamos perante a síntese *in situ*. Se as partículas são sintetizadas antes de serem incorporadas no polímero, servindo este último apenas como meio de dispersão e eventualmente reticulação das partículas, então o método tem o nome de *ex situ*. Na **Figura 8** encontra-se a ilustração de como se processam os dois métodos referidos no caso do desenvolvimento de compósitos poliméricos com partículas metálicas, podendo esta ilustração ser reproduzida para qualquer outro tipo de compostos, como por exemplo para o CaP³⁹.

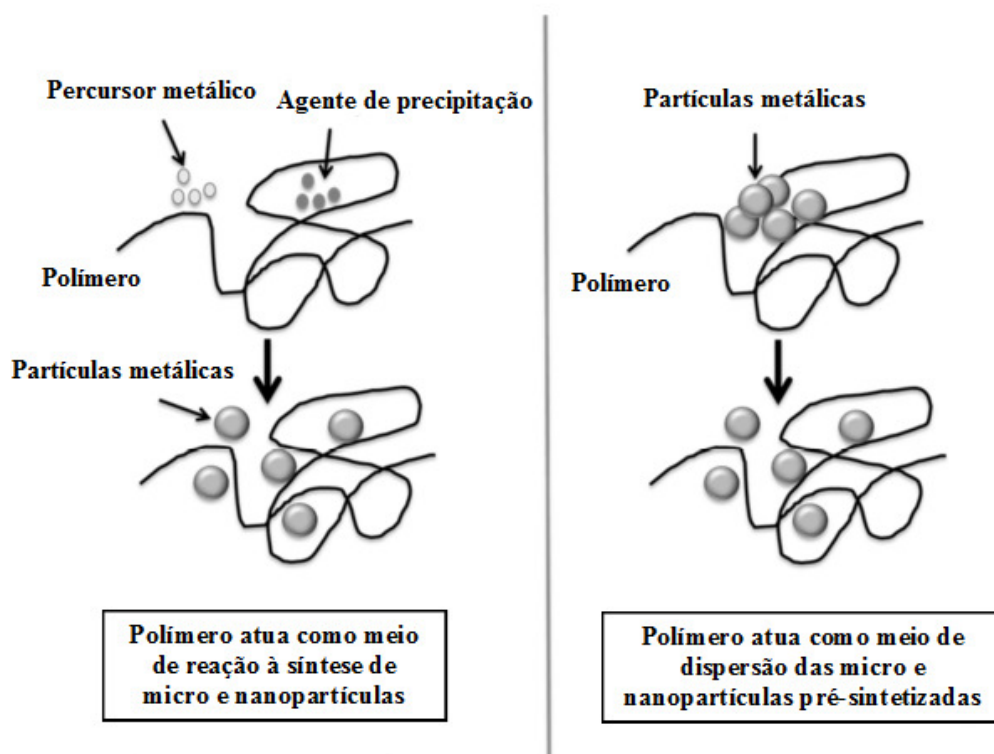


Figura 8 – Técnicas de produção de compósitos poliméricos dopados com micro e nanopartículas
(Adaptado de [39]).

2.5. Membranas multifuncionais à base de quitosano e polietilenoglicol com incorporação de micro e nanopartículas de fosfatos de cálcio, óxido de zinco e cobre – perspectivas

Tendo em conta o que se encontra relatado na literatura quanto ao desenvolvimento de biomateriais com propriedades antibacterianas, osteogénicas e angiogénicas, as perspectivas relacionadas com o novo material a desenvolver são de todo promissoras. Em primeiro lugar, o QS e o PEG possuem uma ótima biocompatibilidade com o organismo, sendo a sua junção uma mais-valia para o desenvolvimento de revestimentos maleáveis, flexíveis e resistentes. Por outro lado, a incorporação de micro e nanopartículas de CaP espera-se que aumentem a biocompatibilidade e bioatividade das membranas, promovendo ao mesmo tempo a formação de osso em implantes ósseos e a regeneração da pele em locais com ferimentos. E por último, a adição de ZnO e CuO é esperado que promova o combate aos microrganismos patogénicos sem que haja toxicidade associada.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Realizado o estudo da literatura relevante para o presente estudo, segue-se a elaboração do procedimento experimental. As principais etapas a cumprir encontram-se de seguida sequencialmente enumeradas:

- 1) **Síntese dos pós:** a síntese dos pós de CaP, ZnO e CuO foi o primeiro passo a executar. Esta fase foi acompanhada por uma série de técnicas de caracterização das partículas obtidas, incluindo a análise das fases cristalinas, natureza química, distribuição do tamanho e morfologia das partículas;
- 2) **Síntese das membranas QS/PEG com diferentes proporções:** diferentes proporções percentuais mássicas entre os dois polímeros utilizados no presente estudo, QS/PEG (50/50, 70/30 e 90/10 %), foram inicialmente avaliadas através de ensaios mecânicos à tração. A proporção que apresentou melhores propriedades mecânicas foi analisada quanto à sua natureza química por comparação com uma membrana formada unicamente por QS, tendo sido esta proporção a escolhida para a concretização dos passos seguintes;
- 3) **Síntese das membranas QS/PEG dopadas com os pós de CaP, ZnO e CuO:** nesta etapa foram desenvolvidas membranas compósitas, usando como matriz polimérica a proporção QS/PEG selecionada na etapa anterior, e incorporando diferentes percentagens de pós inorgânicos. As membranas produzidas foram primeiramente avaliadas através de testes antibacterianos com vista a selecionar a composição mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e -negativas. A composição com o melhor desempenho bactericida foi depois sujeita a testes espectroscópicos para identificação dos seus grupos funcionais, testes de tração para avaliar as propriedades mecânicas das membranas, bem como ensaios *in vitro* por imersão em SBF. Estes últimos serviram para avaliar a biodegradação da membrana eleita e a sua capacidade em formar uma camada apatítica superficial que promova a osteogénese.

3.1. Síntese e caracterização dos pós

A produção de micro e nanopartículas pode ser realizada de várias formas distintas, como por exemplo, através do método sol-gel, precipitação química por via húmida, síntese hidrotermal, entre outras técnicas⁵⁹. No presente estudo, o método utilizado para a síntese dos pós de CaP, ZnO e CuO foi o método hidrotermal. A síntese hidrotermal pode ser entendida como sendo uma reação química entre um precursor de um composto que se pretende obter e uma solução aquosa, em condições de elevada temperatura e pressão, condições essas que são atingidas em autoclaves apropriadas⁶⁰. A solução aquosa é normalmente alcalinizada por um composto que contribui para o aumento do pH do sistema. Esse aumento do pH promove a alteração da curva de solubilidade de uma solução no sentido de facilitar e aumentar a rapidez com que a mesma atinge a sobresaturação, levando, assim, à formação e precipitação de partículas sólidas. Para a síntese dos pós em estudo neste trabalho, o agente alcalino utilizado é um tipo de amida, a ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$). A hidrólise da ureia ocorre a temperaturas superiores a 80 °C, decorrendo da sua decomposição a produção de NH_3 e CO_2 . O NH_3 em reação com a água forma iões amónia (NH_4^+) e OH^- , resultando desta reação o aumento do pH do meio. A hidrólise da ureia resume-se, portanto, na seguinte equação^{61,62}:



Realizada a síntese dos pós por tempo adequado, segue-se a filtragem a vácuo e posterior secagem do produto sólido. Os pós secos são depois sujeitos a um tratamento térmico específico para cada tipo de material, sendo de seguida moídos para promover a desaglomeração das partículas. Na **Figura 9** é apresentado um esquema alusivo aos passos envolvidos na produção dos três pós de interesse.

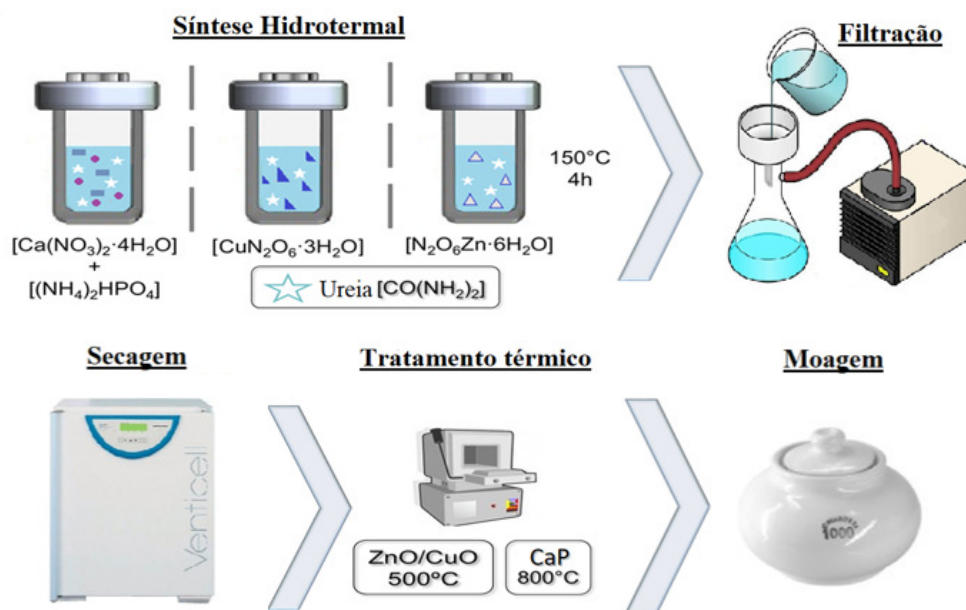


Figura 9 – Esquema alusivo aos passos envolvidos na produção dos pós.

3.1.1. Síntese dos pós de CaP

Para a síntese dos pós de CaP foi utilizada uma razão Ca/P de 1,55. Esta última foi escolhida de modo a ser obtido um pó bifásico composto pelas duas formas de CaP mais utilizadas na biomedicina, a mais estável (HAp) e a mais biodegradável (β -TCP). Com efeito, foi preparada uma solução aquosa com concentração 0,51 M do precursor de cálcio, Nitrato de cálcio 4-Hidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Panreac, Espanha), e outra solução com concentração 0,33 M para o precursor de fósforo, Hidrogenofosfato de diamónio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ (Panreac, Espanha). Ambas as soluções foram preparadas separadamente com água destilada de modo a perfazer um volume de 1000 ml cada. À solução do precursor de fósforo foi ainda adicionada a ureia $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ (Riedel-de Haën, Alemanha) com concentração 0,5 M, concentração essa que se encontra relatada na literatura como sendo a melhor a utilizar para o processamento de pós de CaP⁶³. Por fim, as soluções foram colocadas no interior de uma autoclave concebida no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro, com capacidade de cerca de 3000 ml. Na **Figura 10** é apresentada a autoclave utilizada.



Figura 10 – Fotografia da autoclave concebida no DEMaC para síntese dos pós.

A síntese foi efetuada à temperatura de 150 °C durante 4 horas. Após 4 horas de reação e passado o tempo necessário para arrefecimento da autoclave, a solução com o pó precipitado foi retirada. Esta última foi filtrada sob vácuo, sendo o pó obtido seguidamente seco numa estufa (Venticell) a 100 °C por tempo suficiente para permitir a sua secagem completa (cerca de 72 horas). Os pós secos foram então colocados num cadinho de alumina e submetidos a um tratamento térmico num forno Termolab. Esta etapa consistiu na aplicação de numa taxa de aquecimento de 3 °C/minuto até ser atingido o patamar de temperatura máxima de 800 °C, permanecendo nessas condições durante 2 horas, seguindo-se, por último, o arrefecimento natural até à temperatura ambiente⁶³. Após calcinados, os pós foram moídos com recurso a um moinho mecânico de bolas, com uma razão 1:3 em peso de pó relativamente às bolas, durante 10 minutos, de modo a separar os aglomerados formados durante todo o processo.

3.1.2. Síntese dos pós de ZnO

Para a síntese do pó de ZnO foram preparadas duas soluções de 1000 ml, sendo uma composta por uma concentração de 0,5 M de Nitrato de zinco 6-Hidratado [N₂O₆Zn·6H₂O] (Sigma-Aldrich, Alemanha), e a outra por 1 M de ureia [CO(NH₂)₂]

(Riedel-de Haën, Alemanha). A razão entre as concentrações dos dois compostos foi escolhida de acordo com o que se encontra proposto na literatura como sendo a melhor proporção⁶⁴. Preparadas as soluções, ambas foram introduzidas na autoclave utilizada para a síntese dos pós de CaP, sendo a mesma colocada a 150 °C durante 4 horas⁶⁵. Terminada a reação, a síntese foi retirada, filtrada sob vácuo, sendo os pós separados colocados numa estufa a 100 °C para secagem. Os pós secos foram submetidos a um tratamento térmico realizado a uma taxa de aquecimento de 2 °C/minuto até se atingir o patamar máximo de 500 °C, permanecendo a essa temperatura durante 2 horas, seguindo-se o arrefecimento natural até à temperatura ambiente⁶⁶. Após calcinados, os pós foram moídos num processo igual ao que se utilizou para os pós de CaP.

3.1.3. Síntese dos pós de CuO

Para a síntese dos pós de CuO foram aplicados os mesmos parâmetros utilizados para a produção dos pós de ZnO, visto que as condições de síntese de ambos os óxidos metálicos são muito idênticas⁶⁷. Assim, a temperatura e tempo de reação, os patamares e temperatura de calcinação, bem como o processo de moagem, são passos que se reproduzem da síntese de ZnO para a de CuO. A única diferença entre ambas as sínteses é a solução do precursor metálico, onde, para este caso, essa solução foi preparada com 0,5 M (1000 ml) de Nitrato de cobre 3-Hidratado [CuN₂O₆·3H₂O] (Honeywell FlukaTM, Espanha).

3.1.4. Técnicas de caracterização dos pós obtidos

Os pós de partida foram caracterizados por várias técnicas para identificação das fases cristalinas, da natureza química dos grupos funcionais, distribuição granulométrica das partículas, e análise morfológica.

✓ Difração de raios-X

A identificação das fases cristalinas foi feita por difração de raios-X (DRX). Para o efeito, amostras representativas de cada um dos pós produzidos foram finamente moídas com auxílio de um almofariz e passadas através de uma malha com abertura de 40 µm, de modo a homogeneizar as amostras e minimizar os erros devidos a possíveis orientações preferenciais. As amostras em pó foram posteriormente colocadas num difratómetro de alta

resolução, Rigaku Geigerflex D/Max-Série C, equipado com um monocromador curvo de Cu com radiação $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. Para a recolha de dados foi utilizado um intervalo de varrimento (2θ) de $10 - 80^\circ$, uma largura de passo 2θ de $0,02^\circ$, sendo o intervalo de tempo por passo fixado em sete segundos. Com o *software* HighScore Plus Xpert-pro PANalytical associado ao equipamento foi realizada uma análise semi-quantitativa das fases cristalinas, utilizando como termo de comparação espectros de difração de fases puras/padrão que melhor se ajustavam ao difratograma obtido. A informação cristalográfica das fases padrão encontra-se nas fichas PDF (*powder diffraction files*) registadas pelo centro internacional de dados de difração (do inglês *International Center for Diffraction Data*, ICDD).

✓ Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) é uma técnica que se baseia nas ligações químicas das substâncias, que possuem frequências vibracionais específicas, as quais correspondem aos níveis de energia da molécula (chamados de níveis vibracionais). Esses modos de vibração são mensuráveis quantitativamente pela técnica FTIR, proporcionando assim o conhecimento da natureza química dos materiais. Quando um feixe de radiação infravermelho passa através de uma amostra, parte dessa radiação é absorvida e outra parte é transmitida, sendo o espectro de absorção resultante aquele que permitirá identificar as ligações químicas presentes na amostra⁶⁸. No presente estudo, os espectros de absorção no infravermelho dos pós foram registados recorrendo a um espectrofotómetro de marca Bruker, modelo Tensor 27, com uma resolução de 4 cm^{-1} . Para a aquisição de dados foram utilizados 128 *scans* adquiridos numa gama de $350-4000 \text{ cm}^{-1}$, usando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com uma razão de 2 mg pó para 200 mg de KBr.

✓ Análise granulométrica

A análise granulométrica dos pós sintetizados foi feita num equipamento de difração de radiação laser, o Coulter Particle Size Analyzer (Coulter LS 230, Inglaterra), permitindo a medição de partículas com tamanhos compreendidos entre $0,04 \text{ }\mu\text{m}$ e $2000 \text{ }\mu\text{m}$, usando o modelo ótico de Fraunhofer. As amostras a analisar foram dispersas em água destilada com a adição de algumas gotas de desfloculante (Targon 1128, policarbonato de

amónio, Alemanha). A suspensão de partículas preparada é então colocada num banho de água com ultrassons durante 5 minutos, sendo de seguida efetuada a medição dos tamanhos das partículas.

✓ Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (do inglês *scanning electron microscopy*, SEM) permitiu a análise da morfologia das partículas produzidas, bem como da microestrutura das membranas desenvolvidas. Esta caracterização morfológica é possível pelo feixe de eletrões que é produzido pelo microscópio, que interage com os átomos presentes na amostra emitindo assim vários sinais que contêm informações sobre a topografia e composição da mesma. Neste estudo foi utilizado o microscópio Hitachi, modelo S-4100 (Japão), provido de um sistema de emissão de eletrões com um filamento de tungsténio, aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15 Å.

Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade de cada pó foi dispersa em etanol com a ajuda de ultrassons. De seguida, uma gota dessa suspensão foi colocada na superfície de uma lamela fixa num porta-amostra de alumínio, fixação essa que foi auxiliada pela utilização de pasta/fita de carbono (para além de fixar também ajuda a melhorar a condutividade). Após secagem completa da suspensão numa estufa a 40 °C, as amostras foram submetidas à deposição de um revestimento de carbono com o equipamento Emitech K950, sendo de seguida analisadas pelo SEM.

3.2. Síntese de membranas com diferentes proporções QS/PEG

Como já foi referido, o PEG é adicionado às membranas de QS para incrementar as suas propriedades mecânicas, visto que os compostos formados unicamente por QS são frágeis e quebradiços carecendo de resistência mecânica e flexibilidade. Com efeito, foram sujeitas a ensaios mecânicos à tração diferentes proporções mássicas entre QS/PEG, nomeadamente 50/50, 70/30 e 90/10 %. Este ensaio teve como objetivo determinar os valores máximos de tensão de rutura e de deformação suportados pelo material. Com base nos resultados obtidos, escolheu-se a composição da matriz que apresentava as melhores propriedades mecânicas para prosseguir com os estudos de desenvolvimento das membranas compósitas.

Para a produção dos filmes poliméricos foi preparada inicialmente uma solução de QS com volume suficiente para a realização do ensaio. Para conhecimento desse volume, foi necessário em primeiro lugar estudar a relação existente entre o volume da solução polimérica inicial que se coloca em determinado molde, e a espessura final da membrana que é obtida. Através da realização de testes preliminares de síntese das membranas, foi definido que o molde deverá ser cheio com a solução inicial até uma altura de 5 mm de modo a que no final da secagem a membrana apresente uma espessura cerca de 0,25 mm.

Definida a altura da solução necessária para a obtenção de membranas com 0,25 mm de espessura, resta apenas conhecer as dimensões das membranas e a quantidade de réplicas necessárias para avaliar as propriedades de cada composição. Estes parâmetros foram escolhidos de acordo com a norma ASTM D 882 – 02⁶⁹. Esta norma estipula os métodos a implementar na realização de ensaios mecânicos à tração a filmes poliméricos com espessura inferior a 1 mm. Estabelece o mínimo de cinco réplicas, devendo cada amostra apresentar uma largura compreendida entre 5,0 e 25,4 mm e um comprimento de 100 mm entre os dispositivos de fixação do equipamento. Assim, para cada composição foram produzidas cinco réplicas com as dimensões de 140 x 20 mm (comprimento x largura), cortadas de uma membrana “mãe” de tamanho 160 x 120 mm. Estas membranas “mãe” para as três composições testadas foram produzidas vertendo as soluções poliméricas correspondentes em moldes acrílicos concebidos no DEMaC, com dimensões internas de 160 x 120 mm e apresentados na **Figura 11**.



Figura 11 – Fotografia dos moldes acrílicos concebidos no DEMaC para síntese das membranas a testar nos ensaios mecânicos.

Com uma área da base do molde de 192 cm^2 e uma altura da solução polimérica inicial de 0,5 cm, o volume total de solução de QS que foi necessário preparar para cada composição foi de 96 ml. Reproduzindo para as três composições, no total foi preparada uma solução com um volume cerca de 300 ml. O QS utilizado foi adquirido à Sigma-Aldrich, Alemanha, com peso molecular médio na gama de 190 – 310 kDa, e um grau de desacetilação compreendido entre 75 – 85 %. Por sua vez, o PEG utilizado, detentor de uma massa molecular de 10000 g/mol, foi adquirido à Sigma-Aldrich, Suíça. Para preparação da solução de QS (2 %, p/v), procedeu-se à dissolução de 6 g de QS em 300 ml de uma solução aquosa de ácido acético (2 %, v/v). A solução foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente (T_{amb}) com 700 rpm, até ser atingida a completa dissolução do QS (cerca de 2 horas). De seguida, a solução foi filtrada a vácuo com auxílio de uma malha de 63 μm para separação de impurezas ou de partículas não dissolvidas. Posteriormente, o volume filtrado foi separado em três porções de igual volume (96 ml) para preparar cada uma das três composições desejadas.

A massa de PEG correspondente a cada composição foi primeiramente dissolvida em água destilada, sendo depois misturada com a solução de QS sob agitação magnética a 700 rpm à T_{amb} durante 1 hora. As soluções homogeneizadas foram colocadas nos moldes e deixadas em repouso por um dia à T_{amb} , para completa remoção das bolhas de ar. Posteriormente, as membranas foram colocadas numa estufa a 40 °C para completa evaporação do solvente (cerca de 4 dias). As membranas secas foram depois imersas durante 24 horas numa solução 1 M de NaOH (Sigma-Aldrich, Suécia) para promover a neutralização das cargas positivas do QS formadas em meio ácido, e depois lavadas várias vezes com água destilada. O esquema ilustrativo dos diferentes passos envolvidos na produção das membranas é apresentado na **Figura 12**.

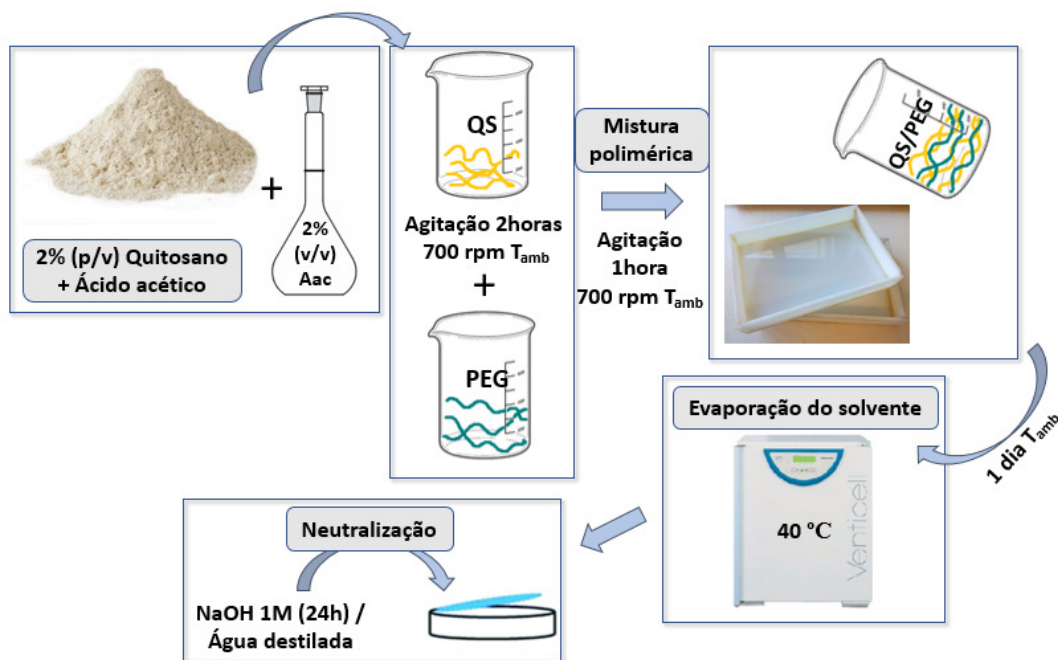


Figura 12 – Esquema ilustrativo dos diferentes passos envolvidos na produção das membranas.

As membranas “mãe” obtidas foram cortadas com auxílio de um x-ato para aquisição das réplicas desejadas, corte esse que foi efetuado com firmeza de modo a não introduzir defeitos nos corpos de prova. Com bastante suavidade foram marcados com caneta de acetato os limites do comprimento central de cada membrana (100 mm).

Para realização do ensaio propriamente dito foi utilizado o equipamento Shimadzu Autograph, Japão, apresentado na **Figura 13**. Este equipamento possui uma parte móvel e outra fixa, sendo a móvel aquela que provoca o estiramento dos corpos de prova.

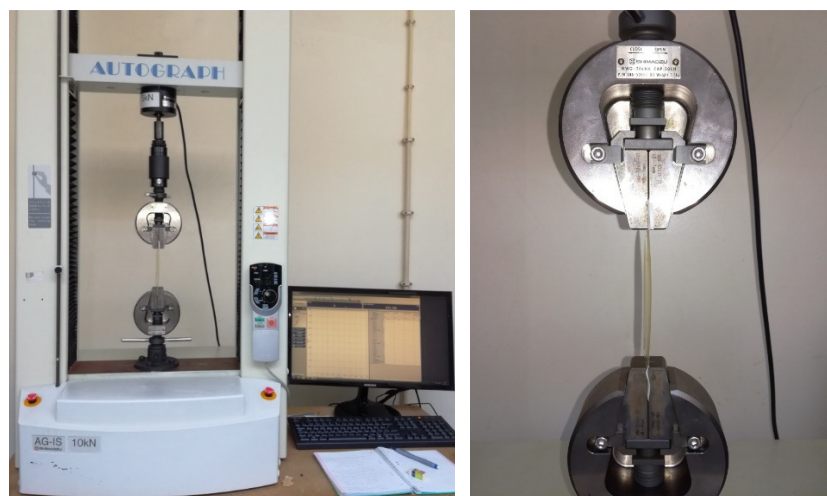


Figura 13 – Aparato implementado na realização dos ensaios mecânicos à tração.

A este equipamento encontra-se associado o *software* Trapezium 2 que permitiu a aquisição de dados e a realização dos cálculos desejados. A velocidade de deformação usada nos testes de tração foi de 50 mm/min de acordo com o estipulado na norma acima referida. Para fixação das amostras nas garras foi utilizado papel de filtro para prevenir o seu deslizamento no decorrer do ensaio, bem como para minimizar a pressão diretamente realizada sobre as amostras. A célula de carga implementada foi a menor que existia disponível, de 5 kN. É também de salientar que o ensaio foi realizado com as membranas humedecidas de modo a que os valores medidos reflitam melhor as propriedades mecânicas das membranas em condições fisiológicas.

3.2.1. Caraterização espectroscópica da membrana com melhores propriedades mecânicas

A proporção dos componentes da matriz que apresentou melhores resultados mecânicos foi analisada por FTIR no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR). Esta técnica permite a obtenção de espectros no infravermelho de amostras difíceis de reduzir a pó para serem moldadas na forma de pastilhas de KBr, com é o caso das membranas desenvolvidas. O equipamento utilizado na espectroscopia ATR possui um cristal opticamente denso e com alto índice de refração no qual é posicionada a amostra a testar. A radiação produzida por este equipamento atravessa o cristal em direção à amostra, sendo totalmente refletida na sua superfície interna, ou seja, o feixe de luz que penetra na amostra irá sofrer perda de energia nos comprimentos de onda em que a mesma absorve, sendo assim produzido um espectro de superfície identificativo da sua natureza química.

Para a realização deste teste foi necessário produzir uma membrana unicamente constituída por QS e outra membrana formada por QS/PEG, de modo a permitir identificar nos espectros de absorção eventuais alterações nas ligações químicas promovidas pela mistura dos dois polímeros. O teste foi realizado no Departamento de Química com recurso ao espectrofotómetro de marca Bruker, modelo Tensor 27, com uma resolução de 4 cm^{-1} (mesmo equipamento utilizado para a análise dos pós), provido com o acessório de ATR Golden Gate (Diamond) da marca SPECAC. Para a aquisição de dados foram empregues 256 *scans* adquiridos numa gama de $350\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

3.3. Síntese e caracterização das membranas compósitas

As membranas compósitas incorporando os pós inorgânicos desenvolvidas a partir da matriz polimérica que apresentou melhores propriedades mecânicas, foram primeiramente testadas quanto às suas propriedades antibacterianas. A composição mais promissora foi escolhida e as membranas resultantes foram posteriormente avaliadas quanto à sua natureza química, capacidade de biomineralização, biodegradação, morfologia e propriedades mecânicas.

As membranas a serem avaliadas nos testes antibacterianos, espectroscópicos e morfológicos, foram produzidas em placas *multi-well* de 12 poços com 2,2 cm de diâmetro, para minimizar ao máximo os desperdícios de material. A solução de QS/PEG foi preparada como descrito anteriormente para a preparação das amostras usadas nos ensaios mecânicos. Os pós inorgânicos foram previamente pesados e depois dispersos numa pequena porção de etanol com auxílio de ultrassons por cerca de 5 minutos. Esta suspensão foi posteriormente misturada com a solução polimérica QS/PEG (aproximadamente 2 ml) usando um misturador (Thinky ARE-250) a 900 rpm durante 2 minutos, para completa homogeneização, e depois colocada no respetivo poço da *multi-well*, sendo este processo repetido para todas as composições de membrana pretendidas. O esquema alusivo à produção das membranas, até à colocação da solução nas placas, encontra-se apresentado na **Figura 14**.

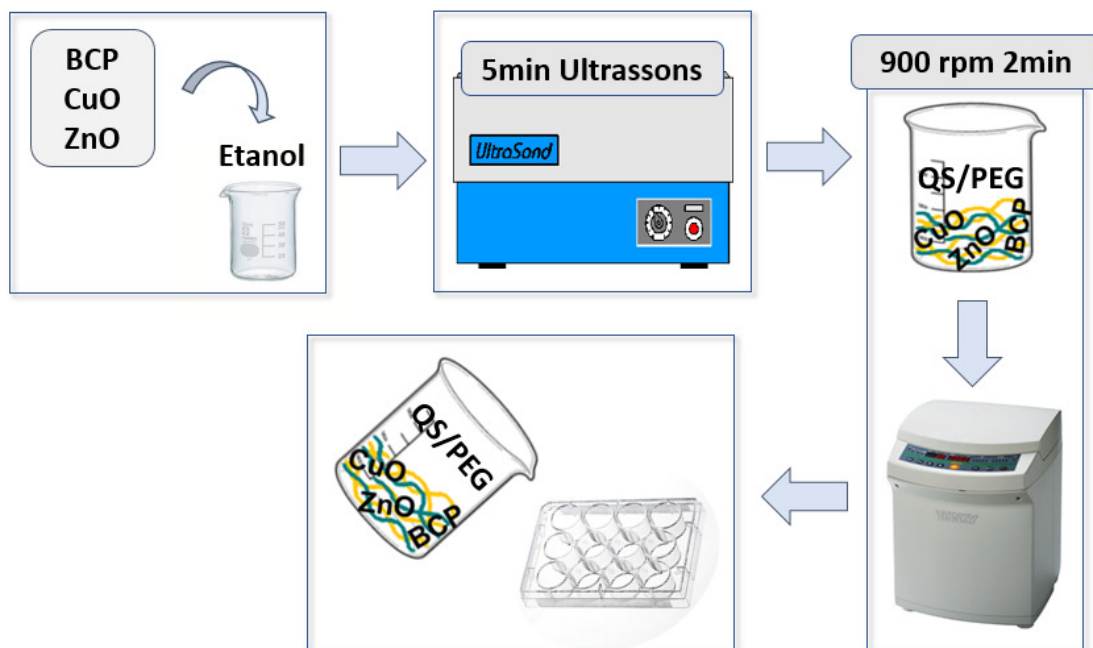


Figura 14 – Esquema alusivo à produção das membranas compósitas nas multi-well.

Após um dia de repouso à T_{amb} para completa remoção das bolhas de ar, as placas com as misturas compósitas foram colocadas numa estufa a 40 °C para evaporação do solvente e obtenção das membranas sólidas. As membranas secas foram imersas durante 24 horas numa solução concentrada de 1 M de NaOH para neutralização das cargas, e depois repetidamente lavadas com água destilada.

Na preparação da membrana dopada para os ensaios mecânicos foi seguido o mesmo procedimento experimental acima descrito, com a única diferença que na homogeneização da solução foi utilizado o agitador magnético a 700 rpm durante 6 horas. Como molde, foi empregue o molde acrílico já apresentado na secção 3.2.

3.3.1. Ensaio antibacterianos

Os teores dos óxidos metálicos incorporados nas membranas foram selecionados com base na análise de dados relevantes publicados, procurando conciliar as suas propriedades antibacterianas com a ausência de toxicidade. A **Tabela 2** apresenta algumas gamas de concentrações testadas, que conjugam boas propriedades antibacterianas e/ou viabilidade celular. As concentrações apresentadas em mg/ml referem-se à massa de óxidos metálicos (em mg) por ml de meio de cultura celular.

Tabela 2 – Gama de concentrações de ZnO e CuO testadas nas quais se atingem boas propriedades antibacterianas e/ou viabilidade celular.

Óxido metálico	Concentração (mg/ml)		Referência
	Propriedades antibacterianas	Viabilidade celular	
CuO	–	0,005	[70]
	–	0,06	[71]
	–	0,1	[72,73]
	0,12 – 0,18	–	[74]
	0,12	–	[75]
	0,8	–	[73]
	0,05 – 0,1	–	[57]
ZnO	–	0,1	[72,76]
	–	0,2	[77]
	0,5	0,5	[78]
	–	1,8	[79]

Após cuidada análise dos estudos referidos, a gama de concentrações de ZnO e CuO incorporadas nas membranas compósitas variou entre 0,2 e 0,8 mg/ml. Por sua vez, a concentração de BCP foi fixada em 6 mg/ml para todas as membranas⁸⁰. A **Tabela 3** reporta a composição mássica das diferentes membranas. Os códigos das amostras referem-se à percentagem em peso de óxidos metálicos em cada membrana, relativa à massa do QS.

Tabela 3 – Composição das membranas preparadas para os testes antibacterianos.

Amostra	QS	BCP	CuO	ZnO
QS/PEG	0,04 g	–	–	–
0 %	0,04 g	0,006 g	–	–
0,5 %	0,04 g	0,006 g	0,0002 g	0,0002 g
1 %	0,04 g	0,006 g	0,0004 g	0,0004 g
1,5 %	0,04 g	0,006 g	0,0006 g	0,0006 g
2 %	0,04 g	0,006 g	0,0008 g	0,0008 g

A ação antibacteriana das membranas obtidas foi testada contra as bactérias Gram-negativa *E. coli* e Gram-positiva *S. aureus*, usando o método de contagem de placas de acordo com a norma ASTM E2149 – 10⁸¹, com ligeiras modificações. Esta técnica baseia-se em colocar o material de teste em contacto dinâmico com uma suspensão de bactérias de concentração conhecida durante 1 hora. Posteriormente, são realizadas diluições decimais (1–10) sucessivas que permitem, após inoculação por sementeira à superfície em meio de cultura *plate count agar* (PCA), quantificar as unidades formadoras de colónias (UFC) viáveis. Esta quantificação é também realizada para uma suspensão de bactérias que não é sujeita à presença de qualquer material, servindo de controlo para o cálculo da percentagem de redução bacteriana promovida pelas diferentes membranas.

O método de ensaio em meio líquido é ideal para testar as propriedades antibacterianas de materiais que, tal como as membranas compósitas produzidas, libertam mais facilmente os seus componentes antibacterianos aquando da internalização dos fluidos envolventes no seu interior. Por outro lado, as membranas têm como principal finalidade a sua implementação no interior do organismo onde se irão encontrar num meio humedecido rico em fluidos fisiológicos, sendo, portanto, o ensaio em meio líquido bastante apropriado à aplicação pretendida.

O ensaio tem uma duração de três dias, sendo apresentadas a seguir as tarefas associadas a cada dia de trabalho:

Dia 1: No primeiro dia do ensaio foram preparados os meios de cultura PCA (Merck, Alemanha) e *tryptic soy broth* (TSB) (Merck, Alemanha) de acordo instruções dos respetivos fabricantes, sendo também preparada uma solução tampão fosfato (pH = 7,2). Os meios de cultura e a solução tampão foram esterilizados com recurso a autoclave. Após esterilização procedeu-se ao espalhamento do PCA em placas com 90 mm de diâmetro, sendo após a secagem completa do meio conservadas a 4 °C.

Neste dia foi também preparada uma cultura bacteriana em meio TSB da espécie *Escherichia coli* ATCC 25922 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ensaios para as duas bactérias realizados em separado). O inóculo foi incubado a 37 °C, durante pelo menos 18 horas, com agitação a 180 rpm.

Dia 2: No segundo dia do ensaio, primeiramente foi medida a densidade ótica do pré-inóculo. Esta medição foi realizada num espectrofotómetro (UVmini – 1240, Shimadzu) com radiação de comprimento de onda de 600 nm, tendo sido utilizado o meio TSB para calibrar o equipamento. Esta medição permitiu determinar o volume de pré-inóculo necessário para preparação de uma suspensão de bactérias com concentração de 3×10^9 UFC/ml. O volume calculado foi retirado da cultura inicial, as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas (2x) em tampão fosfato, para completa remoção de meio de cultura. O *pellet* de bactérias foi re-disperso num volume de 10 ml de tampão fosfato para obtenção da concentração desejada. A partir desta suspensão celular foi efetuada uma diluição decimal para preparar a suspensão de concentração 3×10^8 UFC/ml, para o ensaio de contacto com as diferentes membranas a testar. As membranas retiradas dos poços das *multi-well* (onde foram preparadas) foram cortadas de modo a possibilitar a sua colocação no interior dos tubos. Após adição das membranas, os tubos foram colocados sob agitação (180 rpm) à T_{amb} durante 1 hora.

Passado o tempo de contacto, foram realizadas diluições decimais sucessivas, até à diluição 10^{-5} , para cada uma das amostras preparadas. Posteriormente, cada diluição foi inoculada por sementeira à superfície nas placas de PCA produzidas no dia anterior. Este processo consiste em adicionar 100 µl de cada diluição a cada placa de PCA, sendo o espalhamento da suspensão realizado com o auxílio de microesferas de vidro previamente esterilizadas. A sementeira, para cada uma das diluições, foi efetuada em triplicado. As placas inoculadas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas.

Dia 3: No último dia do ensaio foi efetuada a contagem das UFC em cada placa. O número de UFC presentes nas placas inoculadas com as suspensões de cada amostra testada foi comparado com o número de UFC presentes nas placas inoculadas com a suspensão controlo. Deste modo, a determinação da percentagem de redução da viabilidade bacteriana foi feita de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = 100 - \frac{\text{UFC}_A \times 100}{\text{UFC}_C} \quad (2)$$

Onde UFC_C corresponde à média do número de UFC ponderada para o controlo, e UFC_A corresponde à média do número de UFC ponderada para as amostras. O número de UFC_C ou UFC_A calcula-se do seguinte modo:

$$\text{UFC}_{C/A} = \text{UFC} \times V_S \times F_D \quad (3)$$

Onde F_D é o fator de diluição, V_S é o volume da suspensão inoculada (0,1 ml) e UFC é o número de UFC contadas para cada réplica da diluição em questão.

Todo o procedimento experimental foi realizado em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar e na proximidade de uma chama.

3.3.2. Caraterização espectroscópica

Após cuidada análise dos resultados obtidos na etapa anterior foi eleita a composição de membrana que apresentou melhor ação antibacteriana. Essa membrana foi seguidamente analisada com recurso a várias técnicas de caraterização de materiais, nomeadamente, a técnica FTIR-ATR seguindo o procedimento já descrito na seção 3.2.1 para a análise das membranas apenas constituídas pela matriz polimérica. Neste caso foi necessário obter adicionalmente os espectros de absorção dos pós produzidos, de modo a facilitar a identificação de possíveis picos de absorção correspondentes aos diferentes pós no espectro da membrana dopada.

3.3.3. Avaliação da capacidade de biomineralização, biodegradação e morfologia da membrana

A avaliação da capacidade de biomineralização da membrana eleita e a sua biodegradação *in vitro* foi possível através do estudo do comportamento deste material quando incubado durante diferentes intervalos de tempo numa solução de SBF. O ensaio realizado teve por base a norma ISO 23317:2014(E) que apresenta o procedimento experimental a implementar na determinação da capacidade de um material implantável induzir a formação de uma camada apatítica⁸². Assim, primeiramente foi produzida a

solução de SBF a 37 °C e com pH \approx 7,40, sendo os reagentes necessários para a sua preparação apresentados por ordem de adição na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Composição química da solução de SBF (Adaptado de [82]).

Ordem de adição	Reagente	Fabricante	Quantidade
1º	NaCl		8,035 g
2º	NaHCO ₃		0,355 g
3º	KCl		0,225 g
4º	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Sigma-Aldrich	0,231 g
5º	MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,311 g
6º	HCl		39 ml
7º	CaCl ₂ ·6H ₂ O		0,553 g
8º	Na ₂ SO ₄		0,072 g
9º	TRIS – (CH ₂ OH) ₃ CNH ₂		6,118 g

Os reagentes foram adicionados a 700 ml de água desionizada, um por um e após completa dissolução do reagente anterior, até ao 8º composto (inclusive). Após adição deste último foi medido o pH, tendo este apresentado o valor aproximadamente igual a 2. De seguida, foi adicionado cuidadosamente o último reagente até ser atingido o pH \approx 7,45, momento no qual foi intercalada a adição de TRIS com algumas gotas da solução de HCl, de modo a que, após terminar a quantidade de TRIS a adicionar (6,118 g) o pH final apresente o valor 7,40. Atingido este último, a solução foi colocada num balão volumétrico com capacidade de 1000 ml, tendo sido adicionada água desionizada até perfazer esse volume. Assim, a solução final de SBF preparada possui uma concentração de iões inorgânicos semelhante à do plasma sanguíneo humano, tal como se pode verificar na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Concentração iónica (10^{-3} mol) no SBF e no plasma sanguíneo humano (Adaptado de [82]).

Iões	SBF (pH 7,40)	Plasma Sanguíneo Humano (pH 7,20 – 7,40)
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103,0
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

Para cada intervalo de tempo de incubação em SBF, isto é, 0, 3, 7 e 14 dias, foram adquiridas duas réplicas com 1 cm de diâmetro da membrana “mãe” produzida na *multi-well*, de modo a serem analisadas duas amostras por tempo de incubação. Cada amostra foi colocada individualmente em frascos de polietileno fechados, preenchidos com determinado volume de SBF. Este volume foi calculado de acordo com o estudo de *Popa, A.C. et al.*, que dita que para uma amostra com uma área exposta de 0,50 cm² deve ser utilizado um volume de 1 ml de solução de SBF⁸³. Logo, para as amostras em questão neste trabalho detentoras de uma área exposta de 1,65 cm² foi implementado um volume de 3,30 ml de SBF. Após preparação dos frascos, estes foram colocados numa estufa a 37 °C sob agitação orbital a 75 rpm (Edmund Bühler GmbH, Alemanha). Concluídos os tempos de incubação definidos, as amostras foram retiradas dos respetivos frascos, lavadas suavemente com água desionizada e colocadas num exsiccador contendo sílica gel no seu interior. As membranas secas foram posteriormente preparadas para análise morfológica SEM seguindo o mesmo método de preparação anteriormente descrito para a análise dos pós.

3.3.4. Avaliação das propriedades mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas das membranas compósitas foi feita utilizando o mesmo procedimento acima descrito para as membranas constituídas só com a matriz polimérica. Assim, a preparação dos corpos de prova, as dimensões das amostras e a velocidade do teste foram parâmetros implementados de modo idêntico ao que foi realizado previamente. Para comparar as propriedades mecânicas das membranas dopada e

não dopada, construíram-se dois gráficos de barras com os resultados de tensão máxima de rutura e de deformação máxima suportada pelas membranas. Os resultados da membrana não dopada foram adquiridos do ensaio mecânico efetuado anteriormente neste trabalho.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caraterização dos pós de partida

Os pós produzidos numa primeira etapa do trabalho foram caraterizados segundo as técnicas DRX, FTIR, distribuição granulométrica e SEM. A apresentação dos respetivos resultados será dividida pelos diferentes pós produzidos. Na **Figura 15** encontra-se uma fotografia das amostras dos pós de BCP, CuO e ZnO.



Figura 15 – Fotografia de amostras dos pós de BCP, CuO e ZnO obtidos pela síntese hidrotermal.

4.1.1. Pó de CaP

As fases cristalinas presentes no pó de CaP foram identificadas através da técnica DRX, por comparação com as fichas PDF providas da informação cristalográfica que melhor se ajusta ao espectro de DRX obtido. Na **Figura 16** encontra-se o difratograma do CaP sintetizado, bem como os espectros de difração das amostras padrão de HAp e de β -TCP, tendo sido utilizadas, respetivamente, as fichas PDF #04-015-7245 e #04-006-9376.

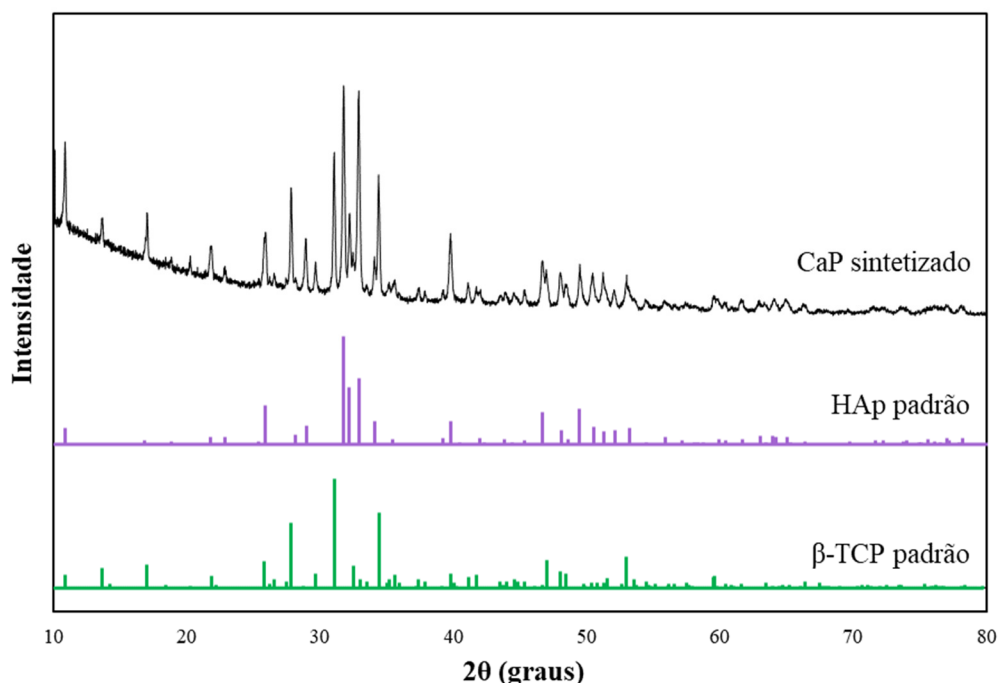


Figura 16 – Difratograma do pó de CaP sintetizado e picos de difração característicos dos compostos HAp e β -TCP padrão.

A partir do difratograma é possível constatar que os dois picos de difração com maior intensidade correspondem à fase HAp de estrutura cristalina hexagonal, a $2\theta = 31,78^\circ$ e $2\theta = 32,92^\circ$. Seguidamente, com intensidade próxima destes dois últimos, encontram-se três picos correspondentes à fase β -TCP de simetria romboédrica, a $2\theta = 27,82^\circ$, $2\theta = 31,03^\circ$ e $2\theta = 34,40^\circ$. A proximidade da intensidade dos picos principais de ambas as fases levam a inferir que as mesmas se encontram em proporções próximas no pó produzido, facto que é comprovado pela análise semi-quantitativa suportada pelo *software* HighScore Plus Xpert-pro PANalytical associado ao equipamento de DRX. Na **Tabela 6** são apresentados os resultados percentuais obtidos pela referida análise.

Tabela 6 – Percentagens das fases cristalinas HAp e β -TCP presentes no pó de CaP sintetizado.

Fase cristalina	Percentagem
HAp	52 %
β -TCP	48 %

Os resultados adquiridos permitem concluir, portanto, que a razão Ca/P utilizada, os parâmetros de temperatura e tempo de reação implementados, bem como o tratamento térmico empregue, foram cruciais para o desenvolvimento de um CaP bifásico (BCP) com percentagens bastante próximas de ambas as fases desejadas, HAp e β -TCP, tendo sido, assim, atingido o objetivo inicialmente pretendido.

Para a caracterização da natureza química do pó foi implementada a análise espectroscópica FTIR, estando apresentado na **Figura 17** o espectro obtido.

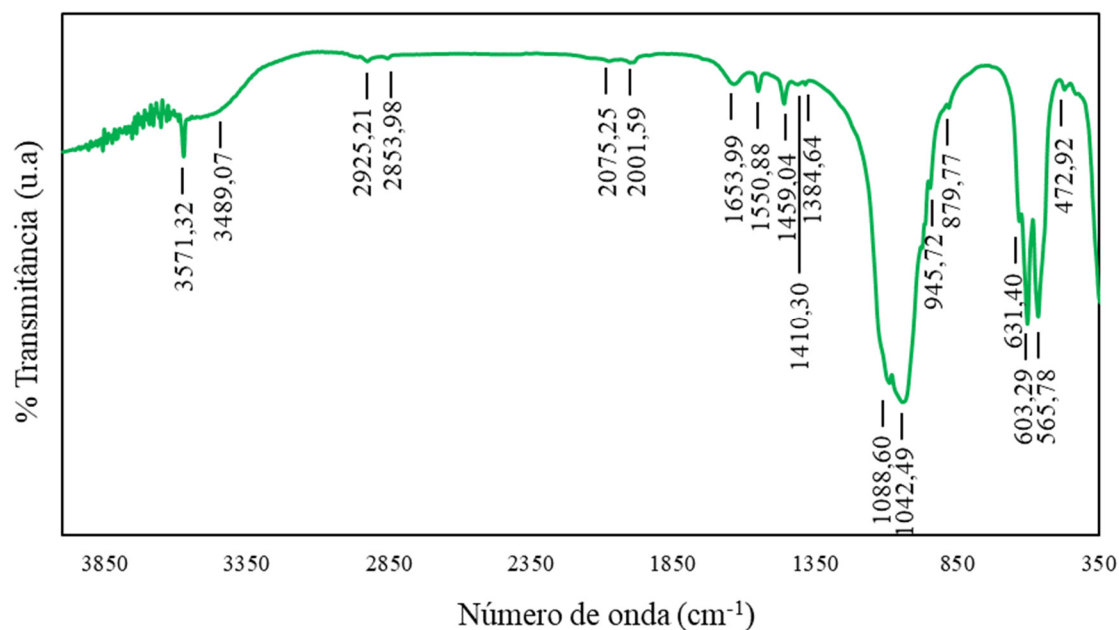


Figura 17 – Espectro FTIR obtido para o pó BCP produzido.

O gráfico adquirido é típico de compostos formados por CaP. Os picos observados a 3489 e 1635 cm^{-1} estão associados à existência de água adsorvida na amostra. A 2075 e 2001 cm^{-1} encontram-se as bandas de absorção características do CO_2 presente na atmosfera. Os picos a 3571 e 631 cm^{-1} correspondem à vibração O–H dos grupos hidroxilo (OH^-) presentes na HAp, e, por sua vez, os picos a 2925 e 2853 cm^{-1} estão relacionados com grupos OH^- isolados que não foram incorporados na estrutura da HAp. Estas espécies iónicas livres podiam ser facilmente eliminadas com a aplicação de uma temperatura de calcinação mais elevada. No entanto, com o aumento da temperatura a HAp tende a sofrer transformação para outras fases cristalinas, nomeadamente para β -TCP, podendo assim levar à perda da proporção pretendida entre a HAp e o β -TCP, ou então ao aparecimento de

outras fases cristalinas não desejadas. Os picos que surgem a 1550 , 1459 e 879 cm^{-1} correspondem à vibração da ligação formada pelos grupos carbonato (CO_3^{2-}) presentes no lugar que deveria pertencer ao OH^- na rede cristalina da HAp, substituição esta que pode também justificar a existência de grupos OH^- livres no pó. Os grupos CO_3^{2-} substituem de igual modo os tetraedros aniões fosfato (PO_4^{3-}) presentes na estrutura cristalina dos CaPs, encontrando-se um ligeiro pico indicativo dessa substituição a 1410 cm^{-1} . O ião carbonato é um composto que normalmente se encontra na HAp sintética, sendo também um dos compostos presentes na arquitetura do osso natural, e, portanto, não é problemática a sua existência. A 1384 cm^{-1} está presente um pico quase impercetível correspondente à ligação N–H do ião amónia que é produzido aquando da reação de hidrólise da ureia a altas temperaturas. Quanto às bandas de absorção mais intensas do espectro, a 1088 , 1042 , 945 , 603 , 565 , e 472 cm^{-1} encontram-se os picos caraterísticos da vibração da ligação P–O dos iões PO_4^{3-} , compostos estes que são típicos de todos os CaPs. Particularmente, o pico a 945 cm^{-1} é caraterístico da fase β -TCP. Este último pico e os picos correspondentes aos grupos OH^- associados à HAp confirmam a produção bem-sucedida de um pó bifásico à base de HAp e β -TCP^{84,85,86}.

A curva representativa da distribuição percentual dos diâmetros das partículas de BCP, após calcinadas e moídas, está apresentada na **Figura 18**.

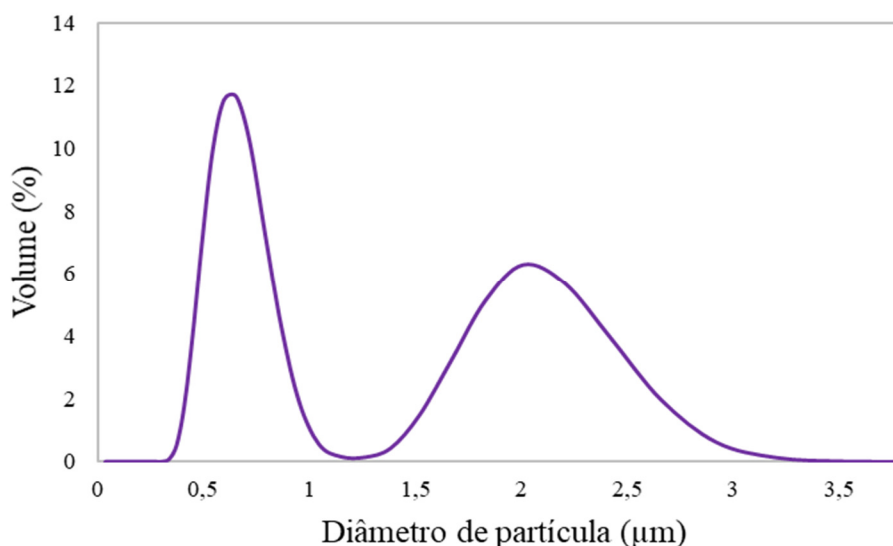


Figura 18 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de BCP produzidas.

As medições foram realizadas pelo menos três vezes, sendo a curva apresentada aquela que melhor representava as curvas obtidas em todas as medições efetuadas. Pelo gráfico é possível observar que a distribuição granulométrica do pó BCP é bimodal, ou seja, possui dois grandes grupos de tamanhos de partícula. O primeiro grupo, compreendido na gama de diâmetros entre 0,3 – 1,2 μm , corresponde às partículas de BCP individuais. Por sua vez, o grupo compreendido entre 1,2 – 3,2 μm é representativo da população de partículas individuais que se aglomeraram, originando diâmetros de partícula maiores. Como referido no Capítulo 3, os pós calcinados sofreram um processo de moagem mecânica com duração de 10 minutos antes da realização desta análise granulométrica. A moagem tem um papel fundamental na desaglomeração das partículas que, entretanto, se aglomeram durante o processo de síntese. Esta aglomeração ocorre devido ao facto de as partículas recém-formadas apresentarem uma elevada razão área superficial/volume como consequência dos tamanhos reduzidos que apresentam, o que resulta numa elevada reatividade e instabilidade. Assim, com o objetivo de ser atingido um ponto mínimo de energia, estas partículas vão-se unir a outras, dando origem a partículas de maiores dimensões⁸⁷. Esta aglomeração seria reduzida se a autoclave utilizada fosse dotada de um sistema de agitação, pois esta promove a colisão entre partículas e separação de possíveis agregados em formação no decorrer da reação. No entanto, os tamanhos das partículas obtidos encontram-se numa gama de valores bastante satisfatória para a aplicação desejada. Se as partículas apresentassem dimensões maiores iriam introduzir defeitos significativos na matriz polimérica onde são dispersas, o que iria resultar numa maior fragilidade das membranas formadas. Contrariamente, partículas de tamanho mais reduzido (como as partículas produzidas), além de serem mais fáceis de dispersar no meio, também favorecem as propriedades mecânicas do compósito. Na **Tabela 7** é possível observar a quantidade percentual de partículas (10%, 50% e 90%) com diâmetros inferiores aos indicados em D_{10} , D_{50} e D_{90} , sendo também apresentada a média dos tamanhos obtidos.

Tabela 7 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de BCP.

D_{10}	D_{50}	D_{90}	Média
0,521 μm	0,744 μm	2,295 μm	1,106 μm

Verifica-se que 50% das partículas obtidas são submicrométricas com diâmetros inferiores a $0,744\ \mu\text{m}$. A média, por sua vez, sobe para diâmetros de partícula mais elevados devido à existência de aglomerados.

A morfologia das partículas, bem como a confirmação dos seus tamanhos, foi possível através da análise microscópica SEM. Na **Figura 19** são apresentadas as imagens adquiridas com diferentes ampliações para o pó BCP.

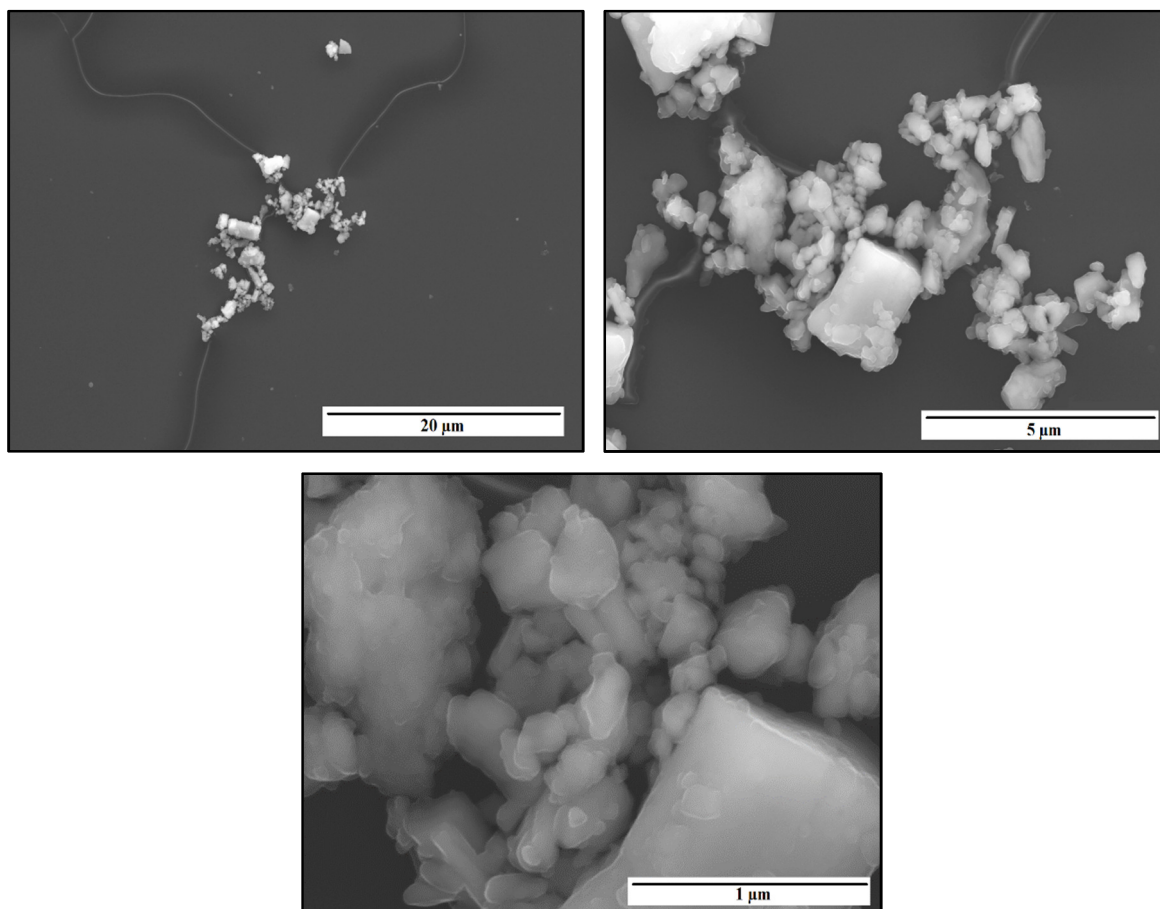


Figura 19 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós BCP com diferentes ampliações.

Os defeitos em forma de riscas que aparecem nas imagens são devidos à cola de carbono que provavelmente se apresentava demasiadamente seca, provocando algumas falhas aquando do seu espalhamento no porta-amostras, falhas essas que não são visíveis a olho nu. Pelas imagens é possível constatar que as partículas têm uma média de diâmetros inferior a $1\ \mu\text{m}$, sendo notória a existência de muitas partículas com uma dimensão bastante reduzida, e agregados de partículas com dimensões maiores formados claramente pela união de partículas mais pequenas. A forma dos cristais não se encontra bem definida,

o que é resultado do processo de moagem que acaba por alterar significativamente a morfologia das partículas inicialmente formadas.

4.1.2. Pó de ZnO

O pó de ZnO foi eficazmente produzido pela síntese hidrotermal, tendo sido obtido um pó unicamente constituído pela fase ZnO como comprova o difratograma apresentado na **Figura 20**. Este último foi desenvolvido por comparação com a ficha PDF #01-078-2585.

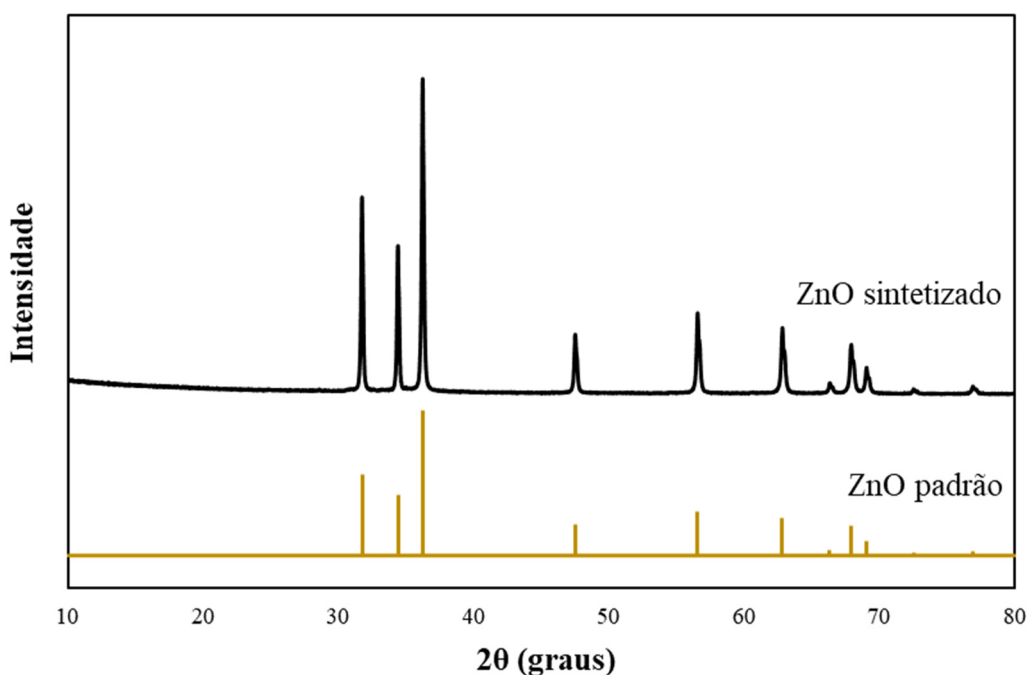
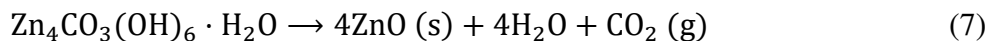
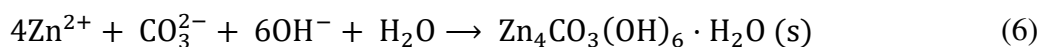
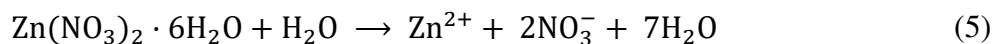


Figura 20 – Difratograma do pó de ZnO sintetizado e picos de difração caraterísticos do ZnO padrão.

Os picos de difração mais intensos encontram-se a $2\theta = 31,74^\circ$, $2\theta = 34,40^\circ$ e $2\theta = 36,23^\circ$. O espectro apresentado demonstra claramente que todos os picos de difração estão associados à estrutura cristalina hexagonal mais típica do ZnO, a wurtzite, não existindo quaisquer outros picos de difração caraterísticos de outras fases^{64,88}. Assim, a pureza do pó sintetizado permite concluir que todo o processo de síntese se encontra adequado à formação de ZnO puro e com elevada cristalinidade. A reação envolvida nesse processo encontra-se esquematizada da seguinte forma:



Primeiramente, com o aumento da temperatura e pressão proporcionada pela autoclave utilizada, a ureia degrada-se rapidamente produzindo compostos que favorecem o aumento do pH (4). Por outro lado, o precursor do zinco em solução dissolve-se nos iões correspondentes Zn^{2+} aquando em contacto com a água (5). Estes iões vão combinar-se com os iões carbonato produzidos pela decomposição da ureia, dando origem ao composto intermédio $\text{Zn}_4\text{CO}_3(\text{OH})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6). Este último é o composto resultante da reação de precipitação, sendo separado por filtração a vácuo e seco numa estufa para remoção das moléculas de água. Após secagem completa, a sua conversão total em ZnO é atingida através da aplicação de um tratamento térmico a 500 °C (7)⁸⁹.

Para apoiar os resultados obtidos pelo DRX e confirmar a pureza do pó de ZnO, foi feito o estudo da natureza química do mesmo através da técnica FTIR. Com efeito, apresenta-se na **Figura 21** o espectro adquirido.

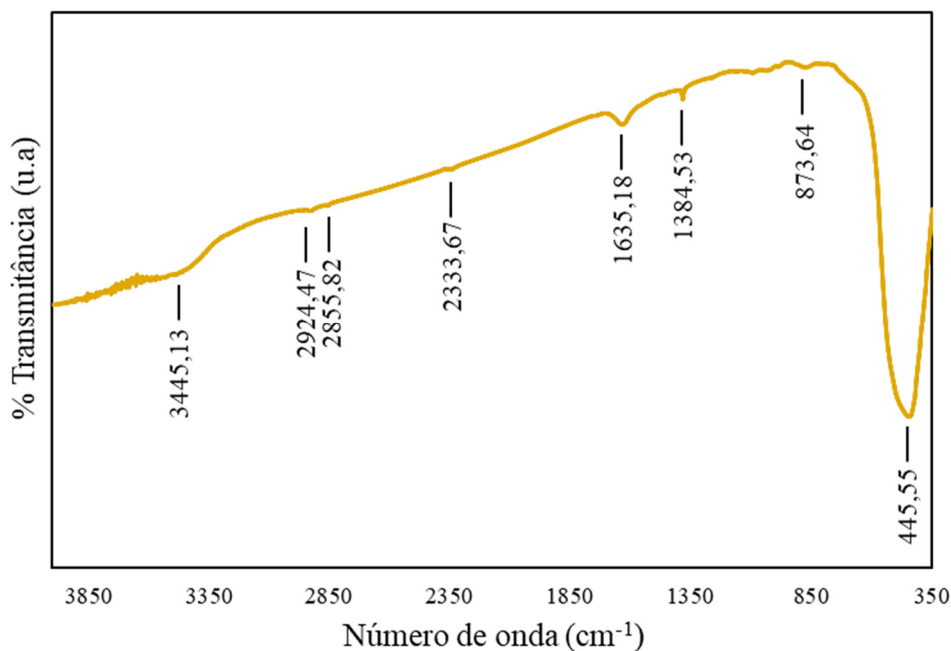


Figura 21 – Espectro FTIR obtido para o pó ZnO produzido.

Pelo gráfico é possível observar um pico de absorção bastante intenso a 445 cm^{-1} que corresponde à ligação Zn–O. Alguns dos restantes picos presentes no espectro encontram-se em posições muito próximas daquelas observadas no espectro FTIR do BCP, nomeadamente a 3445 , 2924 , 2855 , 1635 e 1384 cm^{-1} . A 3445 e 1635 cm^{-1} encontram-se os picos de absorção caraterísticos da ligação H–O–H das moléculas de água adsorvidas na amostra. Os picos a 2924 e 2855 cm^{-1} correspondem ao OH^- produzido em excesso na reação de hidrólise da ureia, sendo através desta reação também produzido o ião NH_4^+ que dá origem ao pico existente a 1384 cm^{-1} . Estes picos são praticamente impercetíveis e insignificantes, no entanto, a sua eliminação total poderia ser conseguida através da aplicação de uma temperatura de calcinação superior à utilizada. Na posição 2333 cm^{-1} encontra-se um pico de absorção associado à vibração da ligação do CO_2 da atmosfera. Por último, a 873 cm^{-1} apresenta-se um pico que poderá corresponder às ligações presentes nos grupos carbonato que também são produzidos no processo de hidrólise da ureia^{90,91}.

A curva representativa da distribuição granulométrica das partículas de ZnO é apresentada na **Figura 22**.

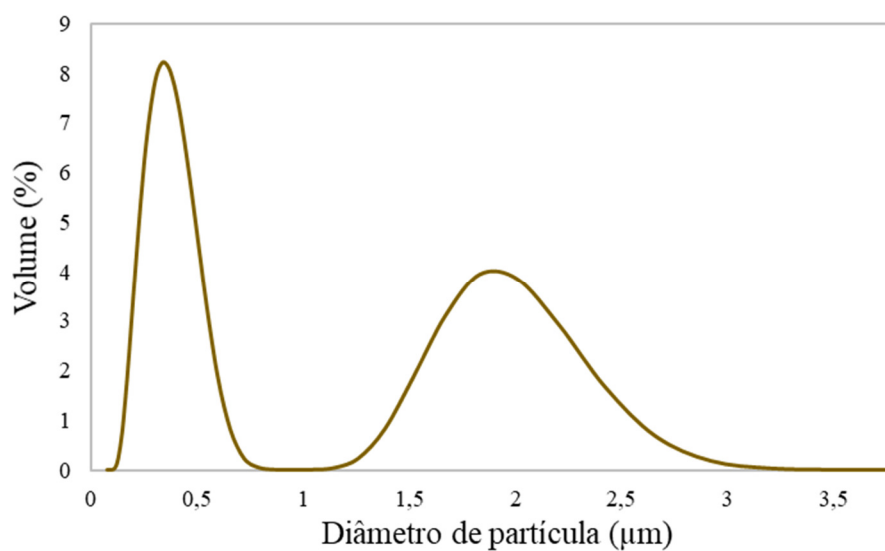


Figura 22 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de ZnO produzidas.

Para conhecimento da percentagem (10%, 50% e 90%) de partículas com diferentes diâmetros, foi feita a avaliação da curva cumulativa inferior a cada um desses diâmetros, avaliação essa que é fornecida pelo *software* associado ao equipamento utilizado. Assim,

os dados referentes à média dos diâmetros de partículas e distribuição quantitativa percentual dos mesmos encontram-se apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de ZnO.

D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Média
0,224 µm	0,385 µm	1,977 µm	0,680 µm

Os tamanhos das partículas de ZnO são bastante mais reduzidos do que aqueles verificados para as partículas de BCP. Tal facto era expectável visto que os principais componentes do BCP, cálcio e fósforo, apresentam raios atómicos maiores do que o raio atómico do zinco. Por outro lado, a composição do ZnO é bastante mais simples que aquela existente em qualquer tipo de CaP. No ZnO constata-se igualmente o impacto dos aglomerados de partículas na distribuição granulométrica do pó (curva bimodal).

De modo a confirmar os resultados anteriores e avaliar a microestrutura das partículas deste óxido metálico, os pós foram observados pela técnica SEM, resultando nas micrografias de diferentes ampliações apresentadas na **Figura 23**.

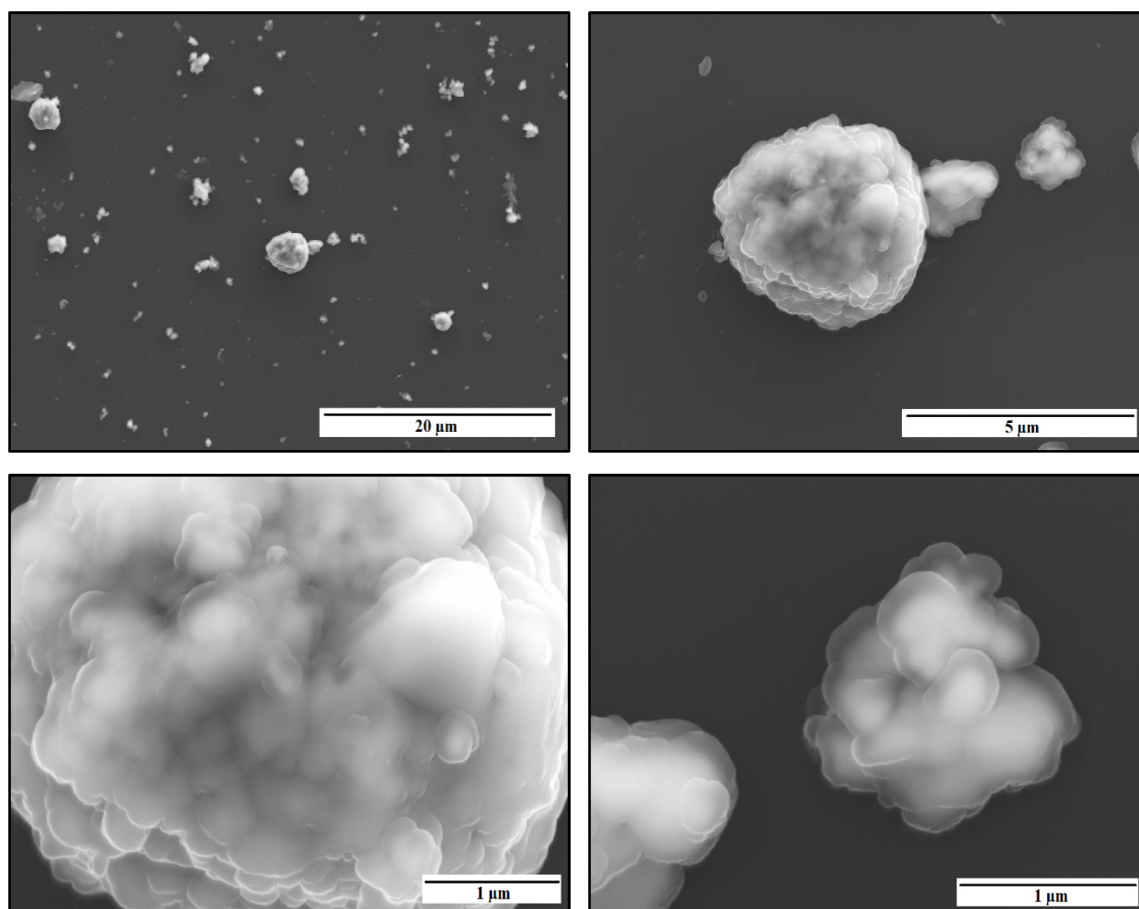


Figura 23 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós ZnO com diferentes ampliações.

É bastante notório pelas imagens que as partículas possuem dimensões muito reduzidas, formando aglomerados relativamente esféricos com dimensões entre 1 – 3 µm, aproximadamente.

4.1.3. Pós de CuO

Os parâmetros implementados na síntese dos pós de CuO foram os iguais aos utilizados para a síntese de ZnO, tal como a razão [precursor metálico]/[ureia], temperatura e tempo de reação na autoclave, e ciclo térmico de calcinação dos pós. Todos estes fatores permitiram a obtenção de um pó de CuO puro, tal como se apresenta comprovado pelo difratograma da **Figura 24**, onde se encontram também os picos de difração padrão adquiridos pela ficha PDF #04-005-4712.

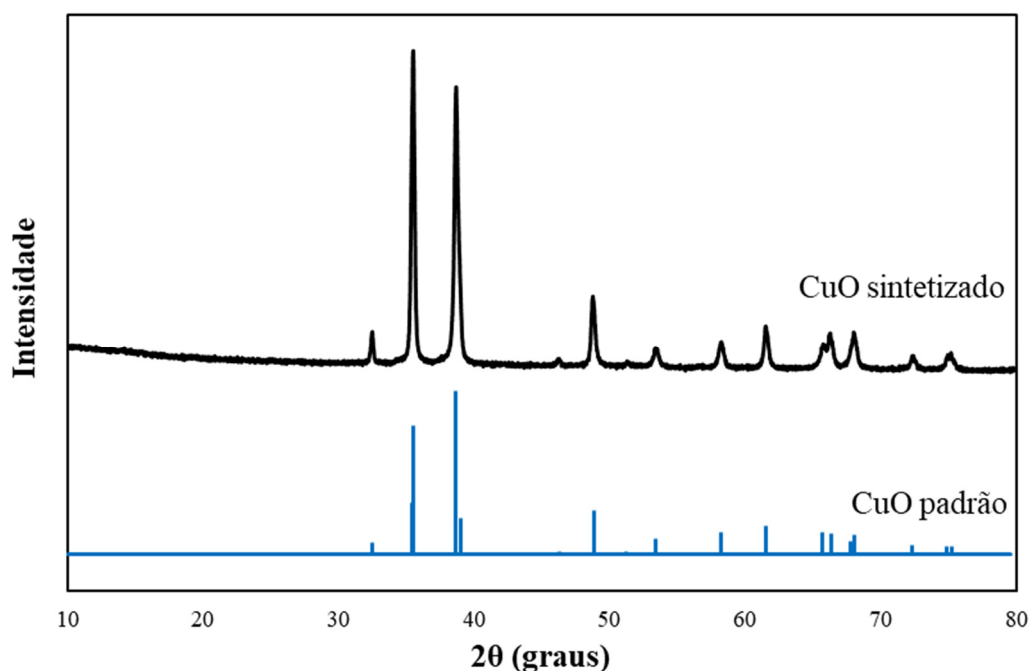


Figura 24 – Difratoograma do pó de CuO sintetizado e picos de difração caraterísticos do CuO padrão.

Os picos estreitos, intensos e bem definidos indicam que o pó sintetizado, com estrutura monoclinica típica do CuO, possui um elevado nível de cristalinidade, sendo os picos de difração mais intensos correspondentes aos ângulos $2\theta = 35,38^\circ$ e $2\theta = 38,97^\circ$. As reações químicas envolvidas na produção de CuO reproduzem-se do que foi descrito para a produção de ZnO.

Pela técnica FTIR foi possível identificar as ligações químicas presentes. Com efeito, apresenta-se na **Figura 25** o espectro obtido.

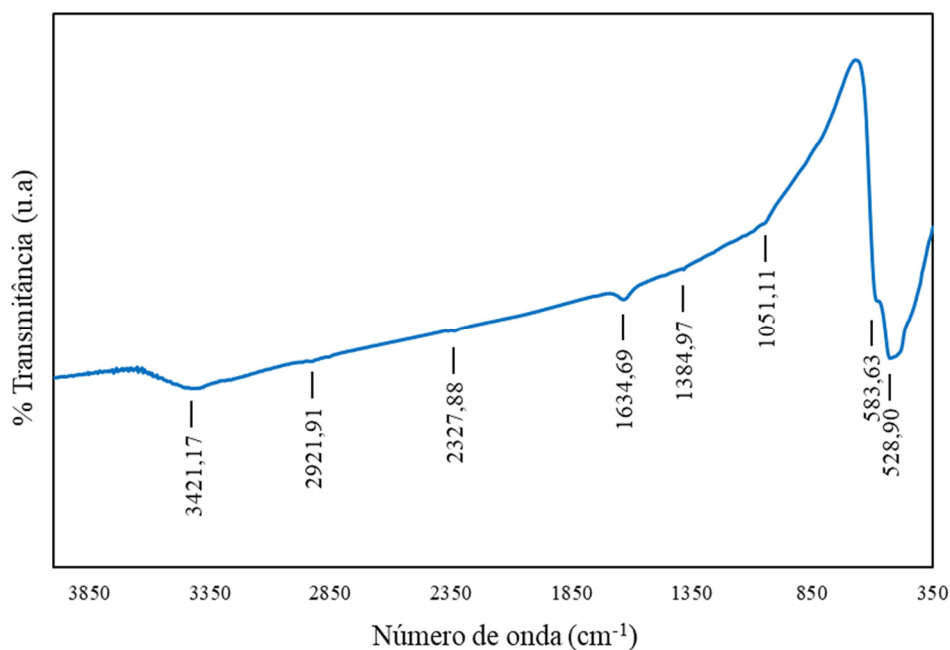


Figura 25 – Espectro FTIR obtido para o pó CuO produzido.

Os picos mais evidentes no gráfico encontram-se a 583 e 528 cm⁻¹, e, como seria expectável, correspondem à vibração da ligação Cu–O. De seguida, a 1051 cm⁻¹ está localizado um pequeno pico de absorção caraterístico da ligação do grupo CO₃²⁻, um dos produtos resultantes da reação de hidrólise da ureia. Igualmente decorrente desta reação, observa-se a existência de mais dois picos a 1384 e 2921 cm⁻¹, correspondentes, respetivamente, aos iões NH₄⁺ e OH⁻. A 2327 cm⁻¹ encontra-se a banda caraterística do CO₂ da atmosfera, e a 3421 cm⁻¹ localiza-se o pico associado à água adsorvida na amostra do pó^{92,93}. Assim sendo, comprova-se a pureza deste pó, bem como a eficácia da técnica de síntese e dos reagentes utilizados para a sua produção.

A distribuição dos diâmetros das partículas é apresentada na **Figura 26**.

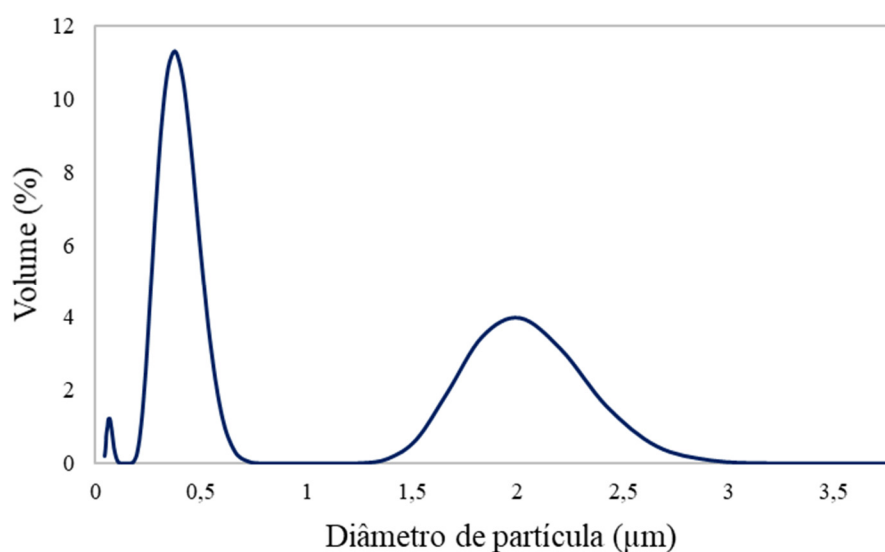


Figura 26 – Curva de distribuição dos diâmetros das partículas de CuO produzidas.

Em conjunto com o gráfico apresentado, encontra-se na **Tabela 9** a distribuição percentual dos tamanhos das partículas, bem como a média dos diâmetros das mesmas.

Tabela 9 – Média e distribuição dos tamanhos das partículas de CuO.

D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Média
0,246 μm	0,396 μm	1,97 μm	0,632 μm

Pela observação do gráfico, é possível verificar que a curva trimodal apresenta uma pequena população de partículas com diâmetros no limiar de detecção do equipamento utilizado, isto é, com 0,04 μm, o que significa que talvez até existam partículas menores que, no entanto, o equipamento não consegue detetar. Estas partículas podem advir da moagem de partículas individuais, ou podem elas próprias ser as partículas primárias que dão origem aos aglomerados de partículas. Neste último caso, a segunda população da curva corresponderia a agregados com tamanhos compreendidos entre 0,2 – 0,8 μm, sendo a terceira população constituída por aglomerados com tamanhos entre 1,2 – 3,2 μm.

Na **Figura 27** são apresentadas as micrografias obtidas pela técnica SEM.

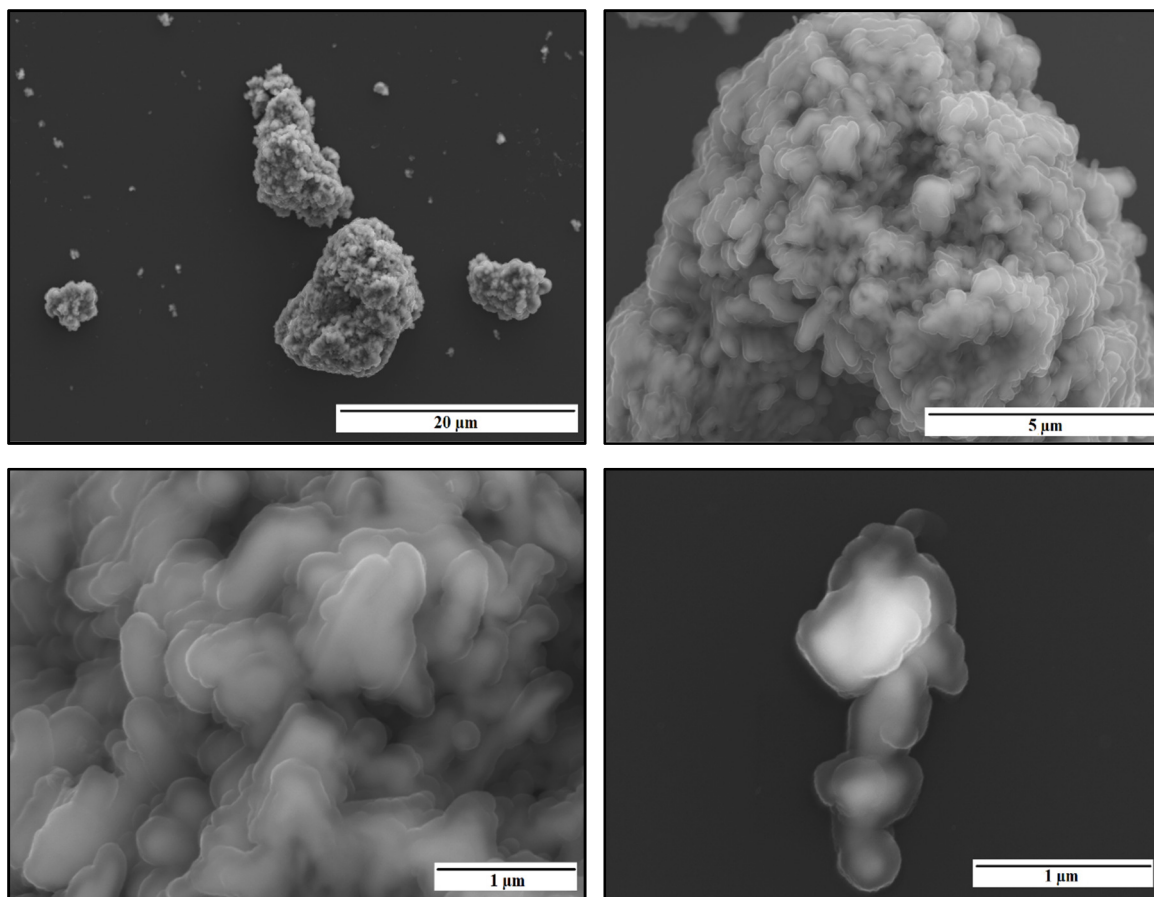


Figura 27 – Micrografias obtidas através da técnica SEM para os pós CuO com diferentes ampliações.

Confirma-se pelas imagens que as partículas de CuO apresentam tamanhos muito reduzidos, e que, como acontece com os restantes pós, formam aglomerados de dimensões maiores.

4.2. Avaliação mecânica das membranas com diferentes proporções entre QS/PEG

As proporções mássicas entre QS/PEG de 50/50, 70/30 e 90/10 %, respetivamente, foram analisadas quanto às suas propriedades mecânicas em ensaios mecânicos à tração. Com efeito, foi medida a tensão máxima de rutura das membranas e a sua deformação sofrida até ao momento da fratura. A deformação foi automaticamente calculada pelo *software* associado ao equipamento utilizado no ensaio, no qual apenas foi necessário introduzir os dados dimensionais das membranas, tais como espessura, largura e comprimento central. É de notar que a espessura foi previamente medida em diferentes

pontos das membranas com auxílio de um paquímetro, de modo a averiguar se o seu valor ao longo do comprimento do corpo de prova não apresentava uma variação superior a $\pm 10\%$, tal como dita a norma. Assim, as dimensões introduzidas no *software* estão apresentadas na **Tabela 10**, sendo acrescentado na mesma o cálculo da área da secção transversal das membranas.

Tabela 10 – Dimensões das membranas utilizadas nos ensaios mecânicos.

Espessura	Comprimento central	Largura	Área da secção transversal
0,25 mm	100 mm	20 mm	5 mm ²

Na **Figura 28** é apresentada uma das réplicas adquiridas da membrana “mãe” 50/50 % produzida. É possível visualizar na membrana as marcas efetuadas com caneta de acetato que limitam o comprimento central de 100 mm, marcas estas que foram cruciais para a correta colocação das membranas nas pregas do equipamento.

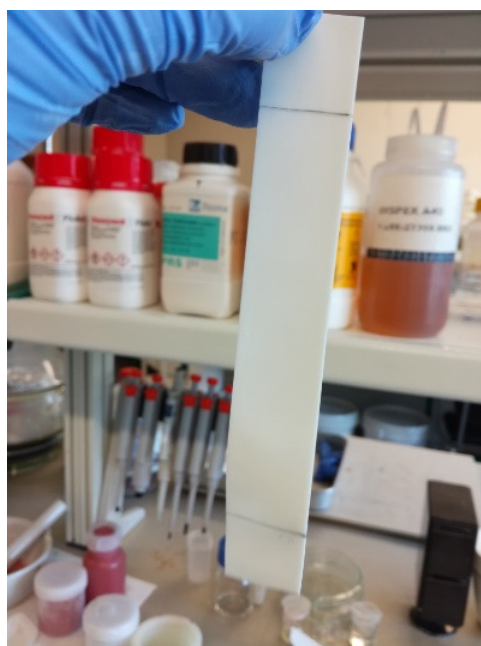


Figura 28 – Membrana 50/50 % (QS/PEG %) produzida para os ensaios mecânicos.

A coloração branca deve-se à grande quantidade de PEG que a membrana apresenta. Quanto menor a percentagem deste polímero adicionado às membranas, mais estas se apresentavam transparentes.

Com base nos resultados experimentais obtidos, elaboraram-se dois gráficos de barras: um com os dados referentes à tensão de rutura dos materiais, e o outro com a sua deformação percentual. Os dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão, tendo sido comparados estatisticamente utilizando a análise de variância (do inglês *analysis of variance*, ANOVA) com um fator – *one-way* ANOVA. Para valores de $p \leq 0,05$ (p indica probabilidade de significância) as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas. A média e desvio padrão foram calculados de acordo com o número de réplicas utilizadas (n).

Na **Figura 29** encontra-se o gráfico com os valores de tensão de rutura para as três composições testadas. A tensão, em MegaPascal (MPa), foi calculada através da divisão entre a força máxima que as membranas suportaram, em Newtons (N), e a área da secção transversal das mesmas, em mm^2 .

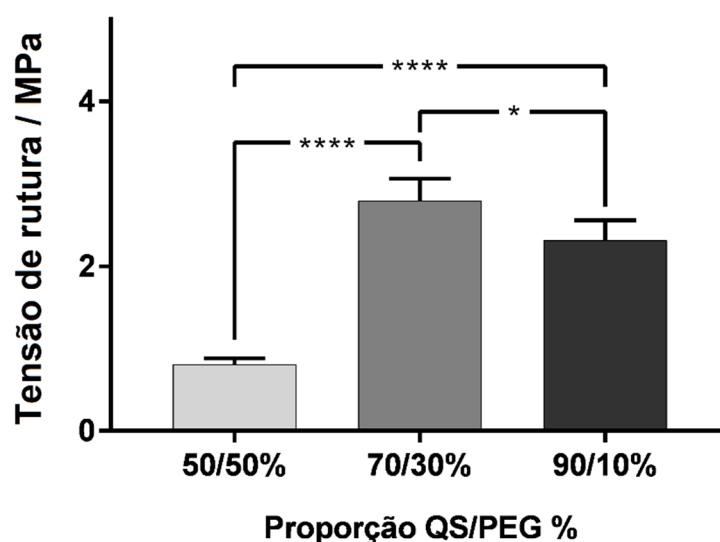


Figura 29 – Gráfico da tensão de rutura (MPa) suportada pelas diferentes composições de membranas (50/50, 70/30 e 90/10 % – QS/PEG %). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). Asteriscos * e **** representam $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente.

Os resultados confirmam que a adição do PEG nas membranas apresenta uma influência considerável na resistência mecânica das mesmas. Para a membrana 50/50 % o valor máximo de tensão atingida foi muito baixo, cerca de 0,80 MPa. Em contrapartida, as membranas 70/30 % e 90/10 % exibiram boa resistência à tração tendo apresentado uma tensão de rutura de 2,80 e 2,32 MPa, respetivamente. Assim, é possível deduzir que não

existe uma relação linear entre a resistência das membranas e a percentagem de PEG que as mesmas possuem. Tal facto pode ser explicado pelas interações estabelecidas entre os dois polímeros nas diferentes proporções produzidas.

Como explicado no Capítulo 2, quando o PEG é adicionado ao QS existe primeiramente a destruição de algumas das ligações existentes na rede polimérica do QS, decorrendo deste processo a diminuição da rigidez das cadeias do mesmo. De seguida, são estabelecidas novas ligações entre o QS e o PEG, de entre as quais ligações hidrogénio intermoleculares que resultam da interação entre os grupos hidroxilo do PEG com algumas porções da cadeia do QS, como os terminais amina ou hidroxilo, como ilustra a **Figura 30**^{94,95}.

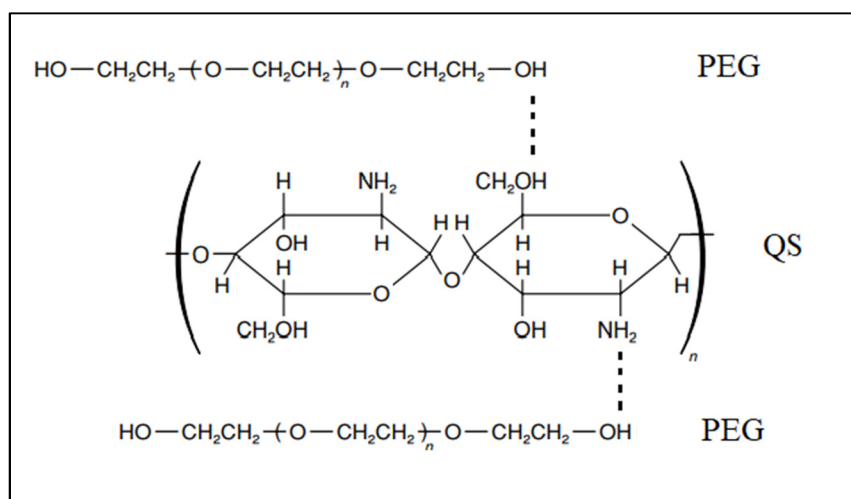


Figura 30 – Ligações intermoleculares (hidrogénio) formadas entre o QS e o PEG (Adaptado de [94]).

Com o aumento da quantidade de PEG, o excesso de grupos OH^- livres irá resultar no desenvolvimento de novas ligações com outros domínios (como por exemplo, com a água que humidifica as membranas), o que provoca a diminuição das forças atrativas entre o QS e o PEG. Uma proporção adequada entre estes dois compostos exhibe uma menor evidência, ou mesmo ausência, destas ligações “extra”, sendo assim promovida a atração entre os polímeros de interesse, resultando, portanto, em melhores propriedades mecânicas. Esta conclusão foi também alcançada no estudo realizado por Zhang, M. et al.⁹⁵. Deste modo, é explicada a baixa resistência mecânica da composição 50/50 % comparativamente às restantes composições ($p \leq 0,0001$). A tensão de rutura da membrana 70/30 % difere

significativamente da membrana 90/10 % ($p \leq 0,05$), sendo portanto evidente que a proporção 70/30 % é aquela que promove uma melhor interação polimérica entre QS/PEG.

Quanto à percentagem de deformação alcançada, esta foi calculada pelo *software* tendo por base a divisão entre a variação do comprimento central da membrana no momento da fratura e o comprimento central inicial, multiplicando o resultado por 100. Na **Figura 31** encontram-se os resultados obtidos relativos a este parâmetro.

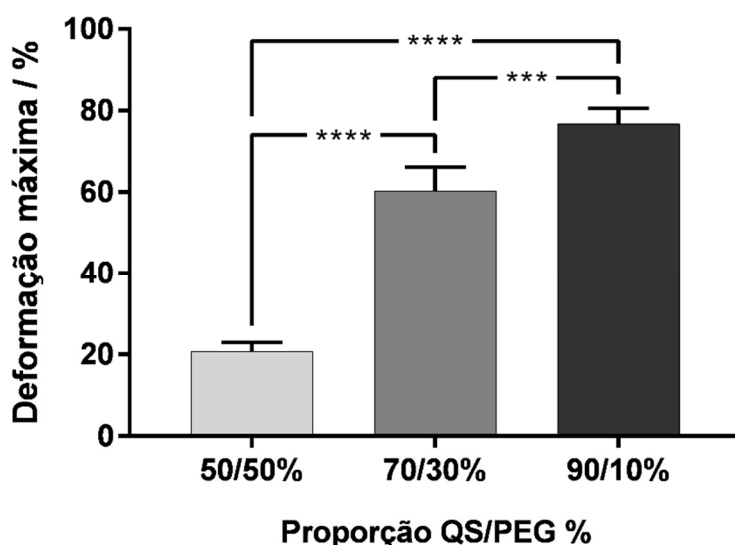


Figura 31 – Gráfico da percentagem de deformação sofrida pelas diferentes composições de membranas (50/50, 70/30 e 90/10 % – QS/PEG %). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). Asteriscos *** e **** representam $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente.

É possível verificar que quanto maior a percentagem de PEG, menor é a deformação atingida pelas membranas. A membrana 50/50 % foi aquela que apresentou a % de deformação mais baixa, 20,91 %, pois a rapidez com que rompeu não permitiu o desenvolvimento de uma % de estiramento significativa. Assim sendo, é evidente que esta composição de membrana não possui boas propriedades mecânicas para a aplicação pretendida. Por sua vez, a deformação sofrida pelas restantes composições 70/30 e 90/10 % foi de 60,36 e 76,77 %, respetivamente. A menor % de deformação alcançada pela composição 70/30 % deve-se ao facto de esta se apresentar mais densa pela maior quantidade de PEG que possui. Essa % foi significativamente diferente daquela alcançada pela composição 90/10 % ($p \leq 0,001$). No entanto, e visto que a membrana 70/30 % foi a

que apresentou melhor resistência mecânica, será esta proporção que será implementada no desenvolvimento das membranas dopadas nas próximas etapas do trabalho.

4.2.1. Caracterização espectroscópica da membrana com melhores propriedades mecânicas

A membrana QS/PEG eleita foi analisada quanto à sua natureza química através da técnica FTIR-ATR por comparação com uma membrana formada unicamente por QS. Através da comparação dos espectros de absorção obtidos para ambas as membranas, foi possível identificar alterações nas ligações químicas do QS induzidas pela adição do PEG, tal como se encontra demonstrado na **Figura 32**.

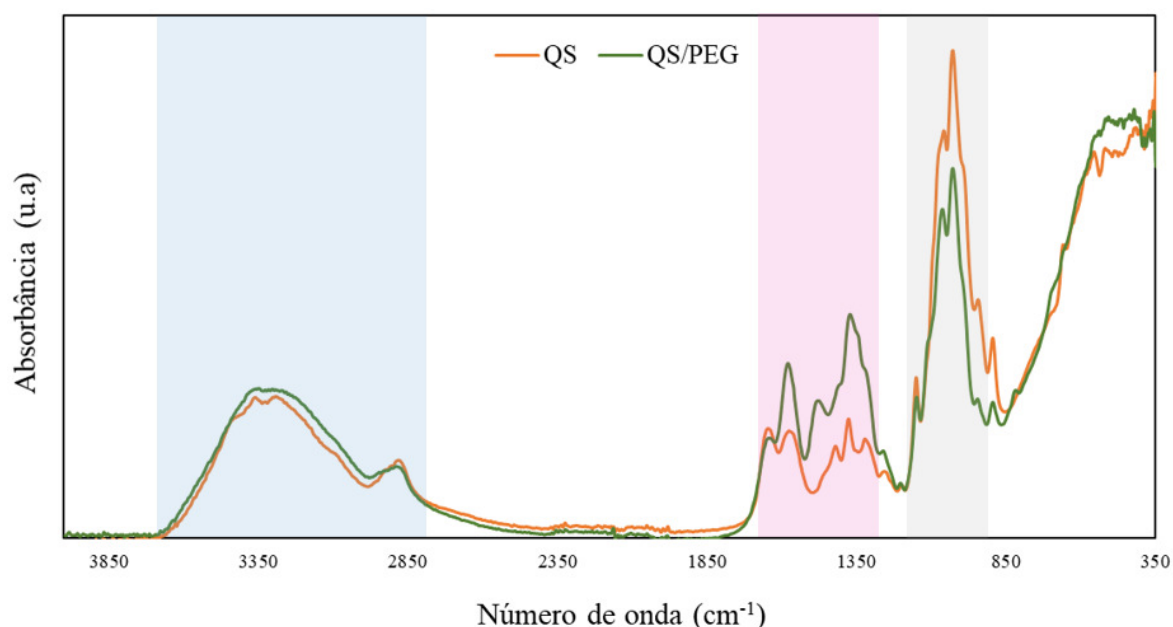


Figura 32 – Espectros FTIR-ATR obtidos para a membrana formada unicamente por QS (a laranja) e para a membrana constituída por QS e PEG de proporção 70/30 % (a verde).

A região colorida a azul no espectro representa a banda de absorção característica do QS resultante da sobreposição da vibração das ligações O–H e N–H, sendo o pico existente a aproximadamente 2880 cm^{-1} correspondente à vibração da ligação do composto alifático C–H. Por sua vez, a região a cor-de-rosa representa a vibração das ligações dos grupos amida I, II e III do QS, sendo os picos principais a 1646 cm^{-1} correspondente à ligação C=O da porção –NHCO– da amida I, e a 1572 cm^{-1} associado à ligação N–H do –NH₂ da amida II. A região a cinzento revela a vibração das ligações estruturais características da

estrutura sacarídea. Por comparação entre os espectros de absorção das membranas de QS e de QS/PEG, as diferenças mais significativas que se podem verificar encontram-se nas regiões do espectro coloridas a cor-de-rosa e a cinzento. Na região rosa é possível constatar uma intensificação dos picos correspondentes à vibração dos grupos amida, com exceção do pico da ligação C=O da amida I que diminui ligeiramente de intensidade. A alteração desta banda pode indicar que o QS se liga ao PEG maioritariamente através de ligações hidrogénio entre os grupos hidroxilo do PEG e as porções amina do QS. Assim, estas ligações levam à deformação da vibração dos grupos amida o que resulta na alteração das bandas de absorção correspondentes a esses grupos. A ligeira diminuição de intensidade da vibração da ligação C=O, característica das porções acetiladas remanescentes no QS, por sua vez, pode estar relacionada com a interação entre esta porção do QS e o grupo hidroxilo do PEG. Este resultado e respetiva justificação foram reportados de forma idêntica no estudo de *Du, Jian & Hsieh, You Lo*⁹⁶. As interações intramoleculares que se estabelecem entre os dois polímeros podem justificar também a alteração das bandas correspondentes à vibração da estrutura sacarídea do QS para valores de menor intensidade (região a cinzento)^{97,98,99}.

4.3. Caraterização das membranas compósitas

Nesta etapa foram produzidas membranas com base polimérica 70/30 % de QS/PEG incorporando diferentes teores em óxidos metálicos, as quais foram primeiramente avaliadas quanto às suas propriedades antibacterianas. Após seleção da composição de membrana compósita mais promissora foram realizados vários testes para a sua caraterização, incluindo análise espectroscópica, análise morfológica, avaliação das propriedades mecânicas, e ensaios de biomineralização em SBF com a finalidade de apurar a capacidade osteogénica da membrana e respetiva biodegradação.

4.3.1. Propriedades antibacterianas

Por forma a determinar a percentagem de inibição do crescimento bacteriano promovida pelas membranas dopadas contra os dois tipos de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, *S. aureus* e *E. coli*, respetivamente, foram realizados ensaios antibacterianos independentes para cada um destes microrganismos com base no método de ensaio em meio líquido e em condições dinâmicas. Como explicado anteriormente, esta

técnica é aquela que melhor se adapta ao tipo de material desenvolvido, sendo também bastante apropriada para a reprodução das condições reais em que as membranas se irão apresentar aquando da sua aplicação.

As membranas concebidas estão apresentadas na **Figura 33**, onde se podem visualizar as diferentes composições produzidas em duplicado para cada bactéria a testar. Na figura é apresentada a solução polimérica dopada ainda no estado líquido (**Figura 33 – A e B**), e já no estado sólido após secagem e neutralização (**Figura 33 – C**). Devido à cor preta que o pó de CuO apresenta, quanto maior a quantidade deste óxido metálico introduzido nas membranas, mais escuras estas tendem a ficar, tal como se pode visualizar na figura.

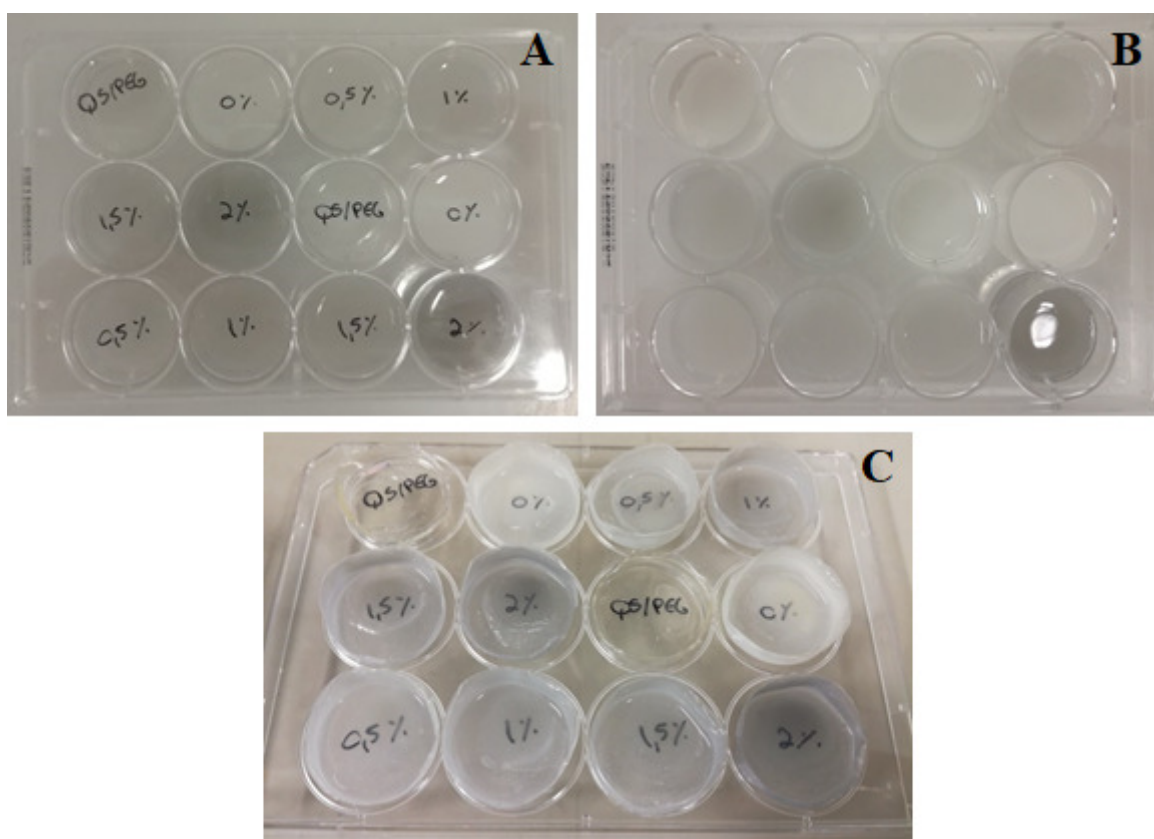


Figura 33 – Membranas produzidas para os ensaios antibacterianos (**A e B** – membranas no estado líquido; **C** – membranas no estado sólido).

A produção das membranas nas *multi-well* de 12 poços visou a utilização integral de cada membrana, eliminando eventuais erros associados à seleção de amostras não representativas de membranas de maiores dimensões. Isto é, as membranas retiradas de

cada poço foram colocadas na sua totalidade nos tubos utilizados no ensaio antibacteriano para contacto com a suspensão de células, sendo assim utilizado todo o material produzido. De facto, se as membranas dopadas fossem desenvolvidas em moldes de maiores dimensões (imaginemos placas de Petri) e se dos mesmos fossem retiradas pequenas amostras para cada ensaio, não seria possível estimar a quantidade de BCP, ZnO e CuO presente nessa porção destacada, pois as partículas podem encontrar-se dispersas heterogeneamente na membrana.

As composições testadas no ensaio para determinação da atividade antimicrobiana estão registadas na **Figura 34**.

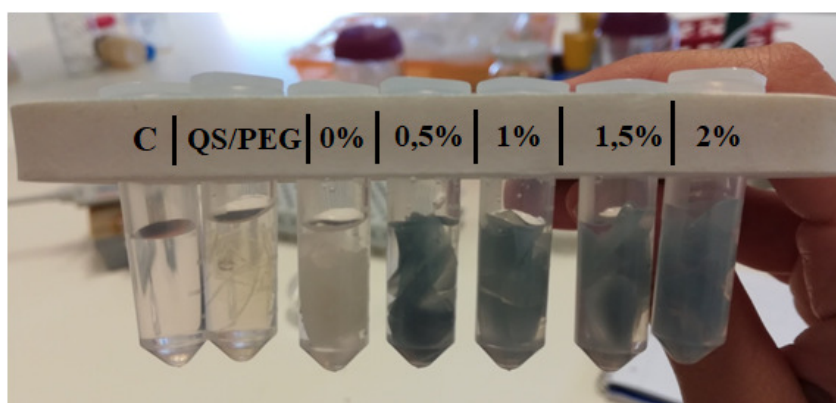


Figura 34 – Tubos preparados para o ensaio com os materiais incorporados e na ausência dos mesmos (C – Controlo).

Na **Figura 35** são apresentadas as placas de PCA com o número de UFC contadas para cada amostra testada, incluído o controlo, sendo estas as contagens representativas do conjunto das três réplicas produzidas para cada diluição.

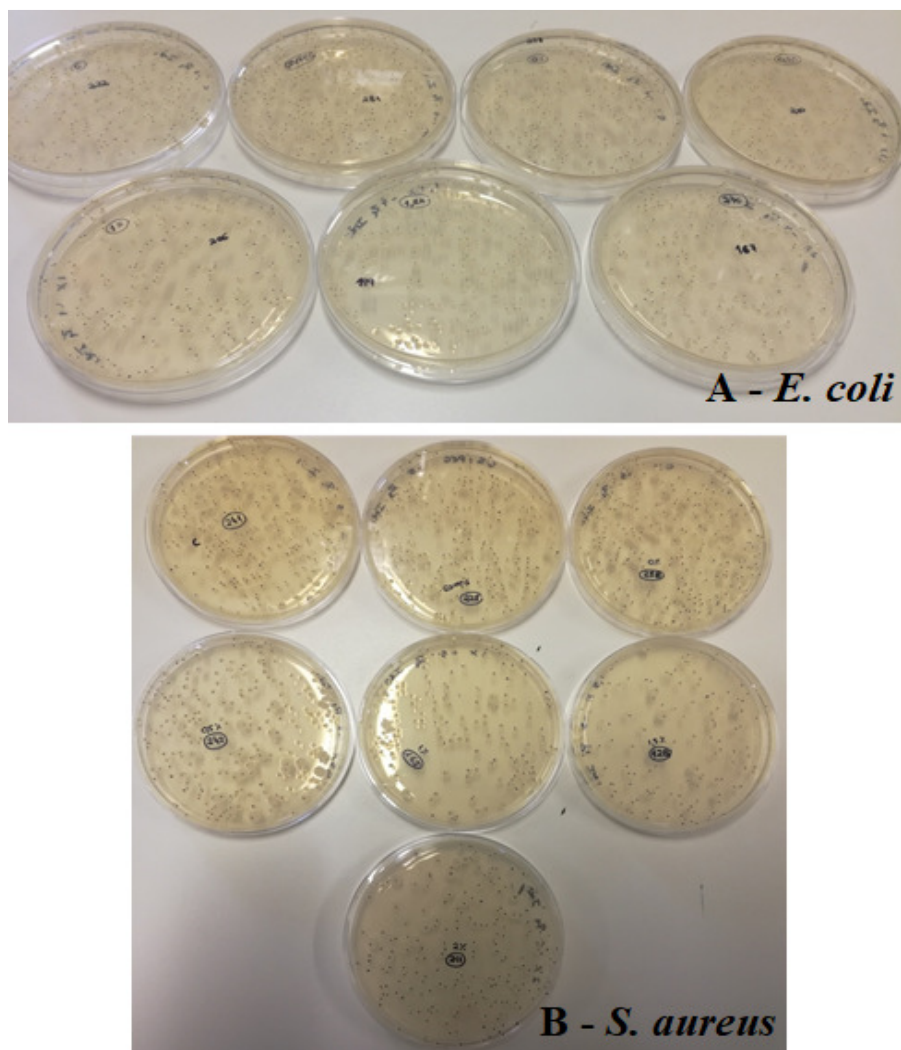


Figura 35 – Demonstração das contagens de UFC efetuadas nas placas de PCA com as diluições inoculadas: diluição 10^{-4} para *E. coli* (A) e 10^{-5} para a *S. aureus* (B), passado 24 horas de incubação. Cada placa corresponde a cada amostra testada, isto é, às diferentes composições de membrana e ao controle.

Para uma análise mais concisa, os resultados obtidos foram representados graficamente na **Figura 36**. Nesta figura encontram-se os gráficos das contagens de *E. coli* e *S. aureus* (UFC/ml) para cada amostra testada, em comparação com o teste controle (ausência de material) (**Figura 36 – A e B**), e ainda o gráfico resultante do cálculo da percentagem de redução do crescimento bacteriano (**Figura 36 – C**), percentagem essa que foi calculada em função do número de UFC contadas para o controle. Para tratamento dos dados foi utilizada a *one-way* ANOVA, onde para valores de $p \leq 0,05$ as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas.

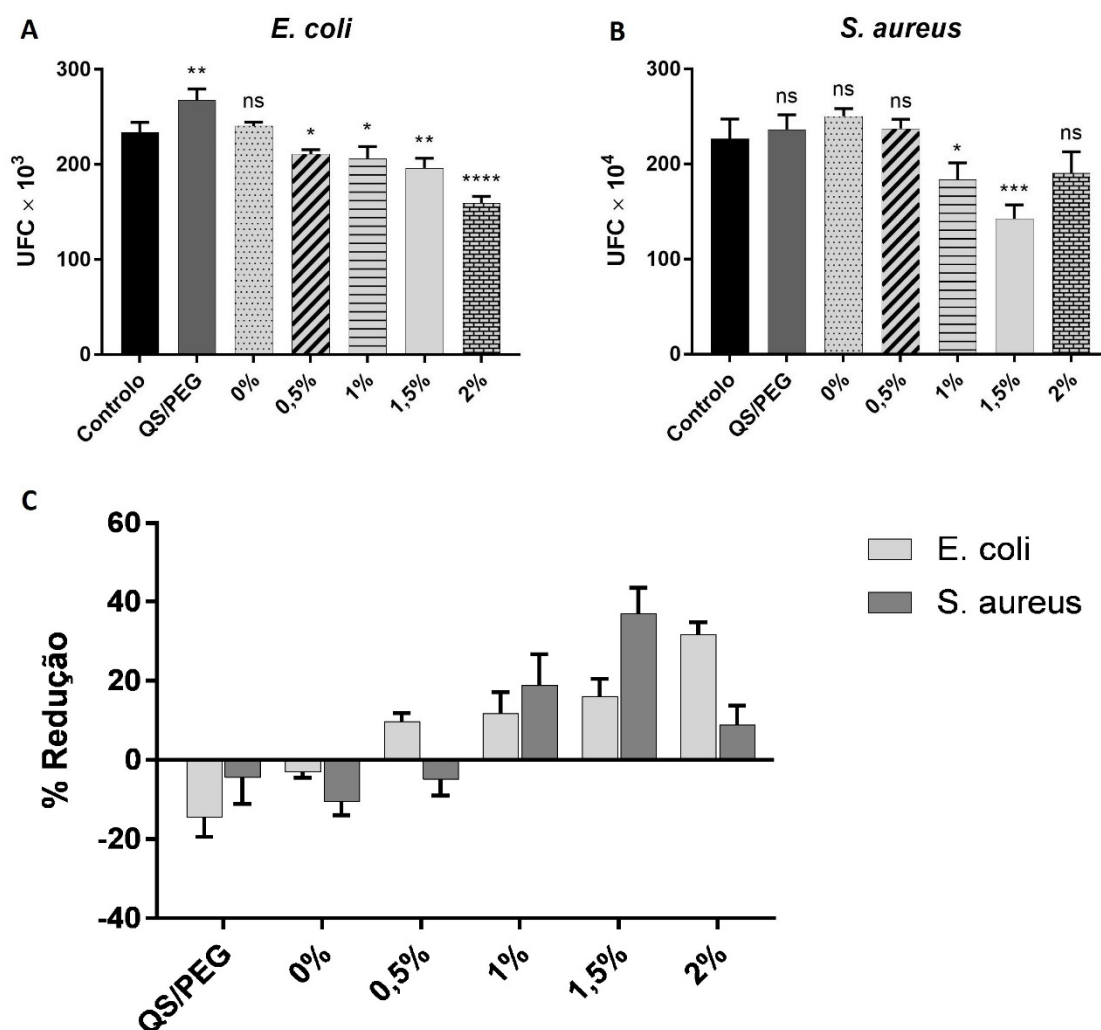


Figura 36 – Determinação da atividade antimicrobiana das diferentes composições de membranas (norma ASTM E2149 – 10). Contagens de (A) *E. coli* e (B) *S. aureus* (UFC/ml); (C) Percentagem de redução do crescimento bacteriano, para *E. coli* e *S. aureus*, promovida pelas diferentes composições de membrana testadas (0 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 % e 2 % – percentagem em peso de óxidos metálicos relativa à massa do QS). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Asteriscos *, **, *** e **** representam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respetivamente. “ns” representa diferença estatisticamente não-significativa.

As membranas dopadas desenvolvidas no presente estudo têm como principal finalidade a sua aplicação como revestimento de dispositivos médicos implantáveis, podendo também ser utilizadas como revestimentos de feridas superficiais, entre outras aplicações. Como tal, o principal objetivo não é uma redução bacteriana absoluta (ação bactericida), mas sim, uma inibição do seu crescimento (ação bacteriostática). Isto é, as membranas deverão impedir o desenvolvimento de biofilmes patogénicos nos locais onde são implantadas no

organismo, sem que, no entanto, provoquem uma alteração significativa do equilíbrio entre microrganismos patogénicos e comensais nesses locais. Por outro lado, não deverão desencadear toxicidade em células humanas, pois os materiais que possuem propriedades antimicrobianas excelentes, mas que careçam de biocompatibilidade, não podem ser utilizados em aplicações biomédicas. Assim, é necessário fazer um balanço entre aquilo que se pretende adquirir com as membranas desenvolvidas, ou seja, propriedades antibacterianas e biocompatibilidade no organismo. Pelos gráficos apresentados verifica-se que a membrana de composição 1 %, incorporada com 0,4 mg de ZnO e 0,4 mg de CuO, é a que apresenta a concentração mínima inibitória em óxidos metálicos. O número de UFC contadas para esta composição, tanto no ensaio para a *E. coli* como para a *S. aureus*, diferiu significativamente do número de UFC contadas para os respetivos controlos ($p \leq 0,05$). Com efeito, esta foi a composição escolhida para dar seguimento ao trabalho.

Ao contrário do que se encontra vastamente relatado na literatura quanto às propriedades antibacterianas do QS, no presente estudo a membrana formada unicamente pela matriz polimérica QS/PEG não promoveu qualquer redução do crescimento bacteriano. Como foi descrito no Capítulo 2, o QS induz a morte bacteriana através da interação entre as suas cargas protonadas NH_3^+ e os resíduos negativos das bactérias. Nas membranas produzidas, essas cargas foram neutralizadas com recurso a uma solução concentrada de NaOH durante 24 horas, sendo eliminado o fator responsável pela atividade antimicrobiana do QS. A posterior lavagem com água destilada promove também a remoção de qualquer vestígio de ácido remanescente da etapa de produção das membranas, ácido que provocaria toxicidade nas células alvo da aplicação. Assim, conclui-se que o processo de neutralização foi realizado com sucesso, sendo possível inferir também que nos estudos onde se comprova que o QS possui propriedades antibacterianas talvez se trate de um QS insuficientemente neutralizado, ou então, um QS não neutralizado de todo¹⁰⁰. Com a incorporação dos pós de BCP nenhuma alteração significativa se verifica comparativamente ao que se sucede com a membrana de QS/PEG, pois o BCP é um material biocompatível não detentor de qualquer toxicidade.

Com a introdução de concentrações crescentes de óxidos metálicos nas membranas é possível constatar uma crescente percentagem de inibição do crescimento bacteriano. Os mecanismos de atuação dos óxidos metálicos contra as bactérias, já explicados anteriormente (Capítulo 2), envolvem principalmente a produção de ROS e a libertação de

iões metálicos. Dependendo do tipo de bactéria, também estes mecanismos de toxicidade possuem maior ou menor eficácia. A bactéria Gram-positiva *S. aureus* é mais suscetível à membrana compósita, sendo a bactéria Gram-negativa *E. coli* a mais resistente. Esta conclusão foi já reportada em outros estudos relacionados^{51,101}, e verificada para as composições com 1 % e 1,5 % em ZnO e CuO. Os resultados para as composições 0,5 % e 2 % contrariam esta tendência, o que pode ser consequência da agitação dos tubos: durante o período de incubação, a agitação pode ter impedido o contacto total das membranas com a suspensão celular. Assim, a concentração de óxidos metálicos total existente na membrana não exerceu a sua ação contra as bactérias, resultando numa percentagem de redução de *S. aureus* inferior do que o observado para *E. coli*.

A sensibilidade ou resistência das bactérias depende da sua constituição, estrutura, metabolismo, entre outros fatores. As bactérias Gram-positiva e -negativa diferem entre si principalmente pela constituição das suas paredes celulares. A parede celular da bactéria Gram-positiva é composta essencialmente por uma camada espessa de peptidoglicano que contém em abundância grupos amida, carboxilo e hidroxilo, e também ácido teicóico e lipoteicóico. Por sua vez, a parede celular da bactéria Gram-negativa não contém os ácidos teicóico e lipoteicóico, mas possui uma estrutura mais complexa devido à presença de uma membrana externa, uma fina camada de peptidoglicano, e ainda fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolissacáridos e proteínas¹⁰². Esta complexidade pode justificar a maior resistência das bactérias Gram-negativas (*E. coli*) face aos agentes antimicrobianos, o que fundamenta os resultados obtidos. Por outro lado, é sugerido na literatura que os iões metálicos apresentam afinidade para os grupos funcionais que as bactérias Gram-positivas apresentam à superfície, o que pode explicar o facto da bactéria *S. aureus* ser mais suscetível à ação bacteriostática promovida por estes materiais¹⁰³.

Com estes resultados comprova-se que foram desenvolvidos materiais que possuem propriedades antibacterianas satisfatórias contra os dois tipos de bactérias Gram-positiva e -negativa.

4.3.2. Caraterização espectroscópica

A composição de membrana eleita anteriormente (1 %) foi caraterizada quanto à natureza química dos seus grupos funcionais através da técnica FTIR-ATR, por comparação com uma membrana formada unicamente pela matriz polimérica QS/PEG.

Para facilitar a identificação dos picos de absorção pertencentes aos diferentes pós incorporados na membrana, foram também analisados os pós BCP, CuO e ZnO através desta técnica espectroscópica. Assim, encontra-se na **Figura 37** os espectros de absorção obtidos para as diferentes amostras analisadas.

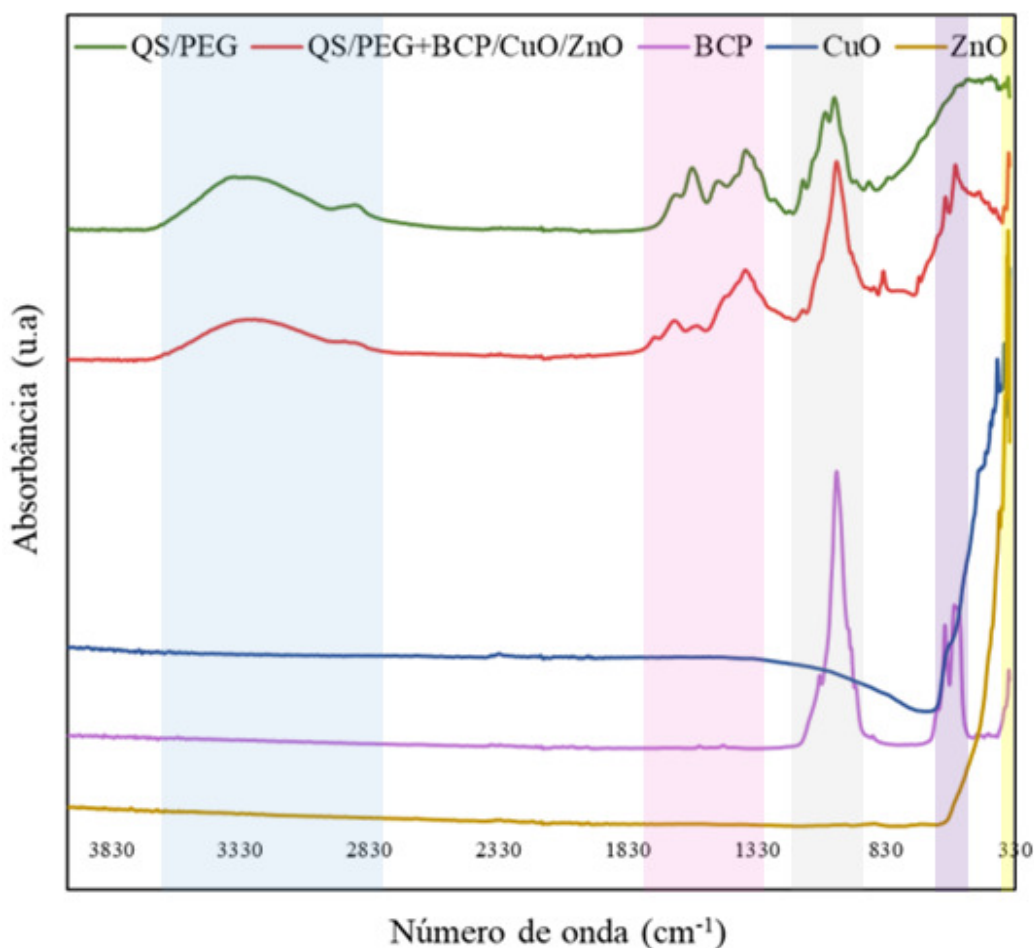


Figura 37 – Espectros FTIR-ATR obtidos da membrana QS/PEG, da membrana dopada (QS/PEG+BCP/CuO/ZnO), e dos pós BCP, CuO e ZnO.

As bandas de absorção mais relevantes no espectro da membrana dopada encontram-se nas regiões coloridas do gráfico. A região azul corresponde à vibração das ligações O–H, N–H e C–H, como já foi descrito (secção 4.2.1). Por sua vez, a região a cor-de-rosa está associada à vibração das ligações dos grupos amida do QS, sendo possível constatar algumas alterações nesta banda consequentes da introdução dos pós inorgânicos na matriz. Esta alteração pode estar associada à formação de ligações, diretas ou indiretas, entre os pós de BCP, CuO e ZnO com as porções amina do QS. Estas porções, quando protonadas

em pH ácido, deverão tender a ligar-se a iões com carga/polaridade negativa, tal como os aniões PO_4^{3-} do BCP. Por sua vez, a estes grupos podem ser ligados os catiões divalentes Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , tal como ilustra a **Figura 38**¹⁰⁴.

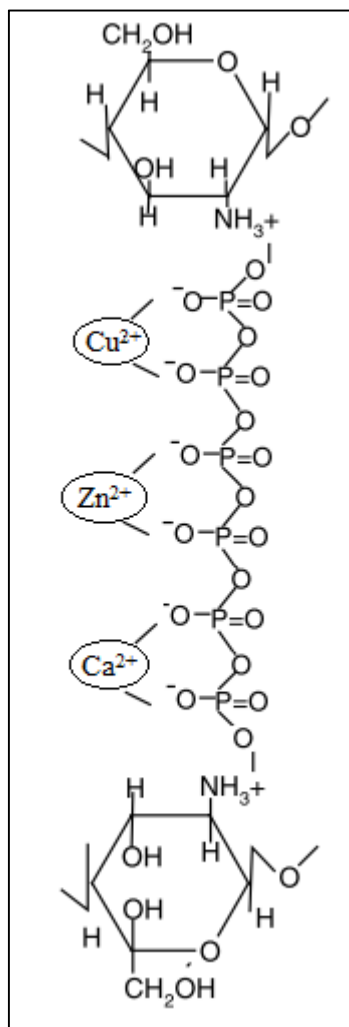


Figura 38 – Ilustração sugestiva da ligação entre os grupos amina da QS e os iões fosfato do BCP, que por sua vez se encontram ligados aos catiões divalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (Adaptado de [104]).

Os catiões podem também ligar-se a grupos amina e/ou hidroxilo da matriz polimérica através da substituição de hidrogeniões. Como resultado, são acrescentadas pontes entre as cadeias do polímero que contribuem para o aumento da sua reticulação, tal como sugere a **Figura 39**^{105,106}.

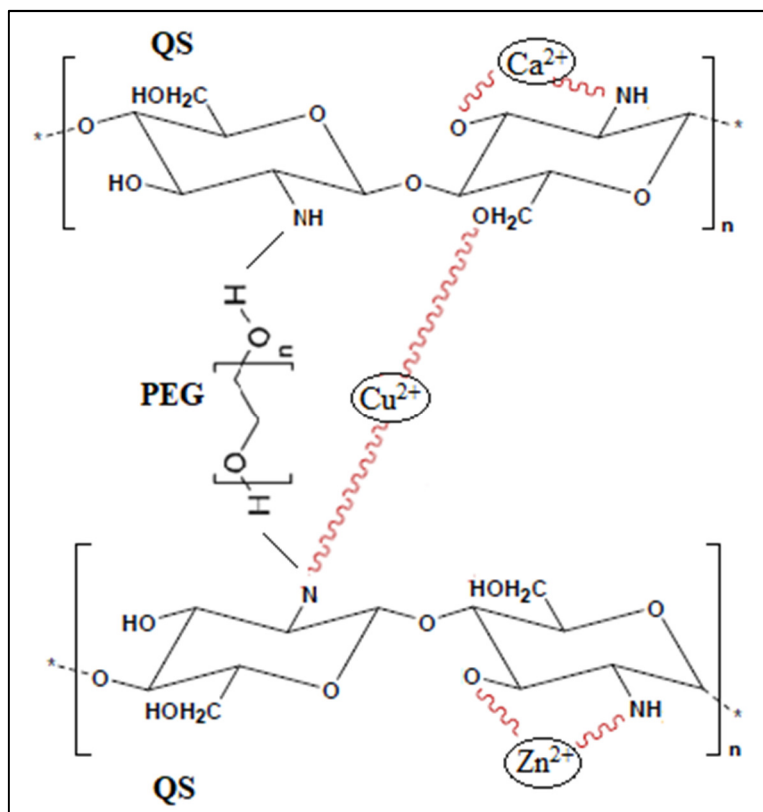


Figura 39 – Ilustração sugestiva da ligação entre grupos amina e/ou hidroxila da matriz polimérica e os cátions divalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (Adaptado de [105]).

As possíveis formas de ligação sugeridas fundamentam a alteração da vibração dos grupos amida do QS no espectro obtido, visto que direta ou indiretamente os pós inorgânicos incorporados influenciam esses terminais. Verifica-se assim a existência de uma forte reticulação das membranas compósitas, decorrente de uma grande variedade de ligações e pontes criadas entre os pós e as cadeias da matriz polimérica.

No seguimento da avaliação do gráfico, a região colorida a cinzento representa uma combinação entre os picos de absorção associados à vibração característica da estrutura sacarídea do QS, e o pico de absorção a 1018 cm^{-1} associado à vibração dos aniões PO_4^{3-} . Estes aniões influenciam de igual modo o espectro da membrana dopada na região colorida a lilás, onde se pode visualizar o aparecimento de dois picos de absorção que não estavam presentes no espectro da membrana de QS/PEG, a 599 e 557 cm^{-1} . Por último, e no limite de detecção da técnica, verifica-se o surgimento de vários picos quase imperceptíveis entre 460 e 364 cm^{-1} que correspondem à vibração da ligação Cu–O do CuO. Um pouco mais

notório é o pico que surge a 350 cm^{-1} que está associado à vibração da ligação Zn–O do ZnO.

Pela análise destes resultados é possível inferir que uma parte dos pós introduzidos nas membranas foi dissolvida nos seus iões correspondentes, iões estes que promoveram a reticulação polimérica. A outra parte não sofreu dissolução, tendo sido as partículas apenas dispersas no meio polimérico. Tal facto é comprovado pelos picos de absorção presentes no espectro correspondentes ao CuO e ZnO, que indicam que estes compostos se encontram inalterados na membrana (não dissolvidos).

4.3.3. Avaliação da capacidade de biomineralização, biodegradação e morfologia da membrana

A incorporação do BCP nas membranas tem como principal finalidade favorecer as mesmas com a bioatividade necessária para que seja promovida uma ótima regeneração dos tecidos ósseos. Assim, com o intuito de avaliar essa capacidade de biomineralização, bem como a biodegradação da membrana, várias amostras foram colocadas numa solução de concentração iónica semelhante à do plasma sanguíneo humano que permite reproduzir da melhor forma as condições em que as membranas se iriam encontrar quando colocadas no organismo. Para o ensaio foram implementados quatro períodos diferentes de incubação das membranas nessa solução: 0 dias (sem incubação), 3 dias, 7 dias e 14 dias. Decorrido cada um desses intervalos de tempo, as amostras foram retiradas do SBF, lavadas suavemente com água desionizada, sendo seguidamente secas para posterior avaliação da sua morfologia através da técnica SEM. Com efeito, encontram-se na **Figura 40** as micrografias obtidas com diferentes ampliações ($\times 100$ e $\times 2000$) para cada tempo de incubação.

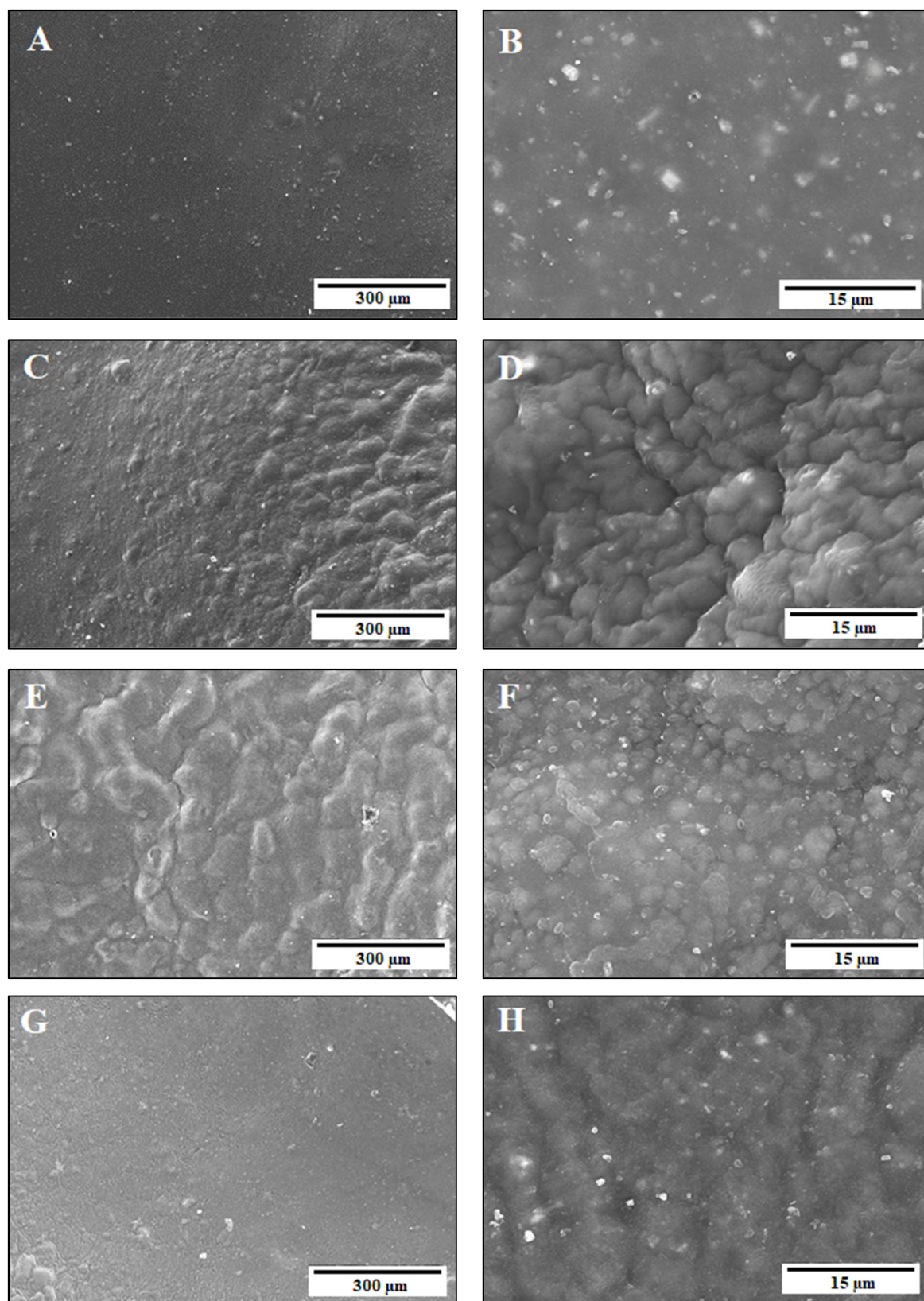


Figura 40 – Micrografias obtidas com diferentes ampliações (x100 e x2000) para as membranas incubadas em SBF durante: **A e B** – 0 dias; **C e D** – 3 dias; **E e F** – 7 dias; e **G e H** – 14 dias.

Pela comparação das imagens é possível observar que à medida que aumenta o tempo de incubação em SBF, dos 0 dias aos 3 dias, a rugosidade do material tende a aumentar, sendo posteriormente suavizada entre os 3 dias e os 14 dias. Este aumento da rugosidade superficial pode apontar para que tenha ocorrido uma deposição gradual de partículas de CaP na área exposta da membrana, à medida que a mesma ia sendo biodegradada pelo meio envolvente. Assim, com a progressão do tempo de exposição ao SBF mais partículas vão sendo reprecipitadas, resultando a curto prazo na formação de uma camada apatítica superficial sólida e uniforme à superfície da membrana. Esta uniformização pode ser constatada por comparação das micrografias obtidas entre os 3 dias e os 14 dias, sendo a diferença mais significativa observada entre os dois últimos tempos de incubação. Deste modo, presume-se que a membrana compósita desenvolvida neste trabalho tenha uma boa capacidade de biomineralização em contacto com fluidos fisiológicos, sendo esta característica, em conjunto com a biodegradação apresentada, qualidades altamente desejáveis para aplicação deste material na regeneração de tecidos ósseos.

4.3.4. Propriedades mecânicas

A membrana compósita foi ainda avaliada quanto às suas propriedades mecânicas por comparação com a membrana de igual composição polimérica, mas sem os pós inorgânicos incorporados. Com efeito, na **Figura 41** é apresentada a membrana dopada produzida para o ensaio, onde se pode visualizar a membrana “mãe” (**Figura 41 – A e B**) e uma das suas réplicas adquiridas já com as marcas com caneta de acetato efetuadas (**Figura 41 – C**).



Figura 41 – Membrana compósita produzida para os ensaios mecânicos (A e B – membrana “mãe”; C – réplica adquirida).

Por sua vez, na **Figura 42** encontram-se os gráficos de barras produzidos para ambas as membranas testadas, referentes aos parâmetros avaliados de tensão de rutura e deformação máxima suportada. O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao teste t com correção de Welch. Para valores de $p \leq 0,05$ as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas.

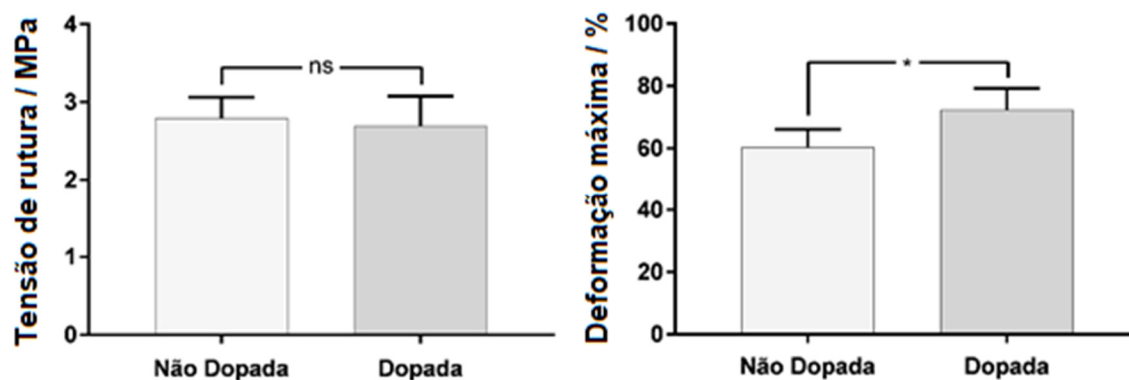


Figura 42 – Comparação das propriedades mecânicas das membranas não dopada e dopada (com 1 % em peso de óxidos metálicos – percentagem relativa à massa do QS). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 5$). “ns” representa diferença estatisticamente não-significativa, e asterisco * representa $p \leq 0,05$.

Pela observação dos gráficos é possível deduzir que não existem diferenças significativas para a tensão de rutura das membranas dopada e não dopada ($p > 0,05$). Tal facto indica

que os pós adicionados à membrana não se encontram apenas dispersos na sua matriz polimérica, mas sim, maioritariamente estabelecem ligações com as cadeias poliméricas (ligações propostas na secção 4.3.2). Se as partículas estivessem predominantemente dispersas no polímero e não ligadas ao mesmo, provavelmente a resistência mecânica sofriria um decréscimo considerável pelo simples facto destas partículas não serem mais nem menos que defeitos pontuais introduzidos numa rede polimérica organizada que é a do QS/PEG.

Analisando a percentagem de deformação máxima, observa-se um aumento de cerca de 12 % na deformação percentual atingida pela membrana dopada comparativamente à membrana não dopada ($p \leq 0,05$). Este resultado pode indicar que as ligações desenvolvidas entre os pós e os polímeros promovem o relaxamento estrutural do compósito, sendo este efeito de plastificação também constatado aquando da adição do PEG ao QS. Conclui-se, portanto, que a introdução das partículas inorgânicas nas membranas vem favorecer as propriedades mecânicas das mesmas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusão

O presente estudo teve como objetivo principal o desenvolvimento de um biomaterial com propriedades antibacterianas, suscetível de ser aplicado na regeneração de tecidos danificados. Com efeito, foram produzidas membranas de QS e PEG nas quais foram incorporadas micro e nanopartículas de BCP, CuO e ZnO. A matriz polimérica formada pela conjugação dos dois biopolímeros teve por finalidade conferir a forma e resistência mecânica às membranas. Por sua vez, os pós de BCP tiveram por objetivo primordial favorecer o filme polimérico com capacidades osteocondutoras excelentes que são essenciais para o processo de regeneração de tecidos ósseos. Por último, a função os óxidos metálicos CuO e ZnO foi potenciar sinergicamente a ação antibacteriana necessária para a prevenção de infeções microbianas.

Os pós de BCP, CuO e ZnO foram sintetizados através do método hidrotermal utilizando a ureia como agente de precipitação. As técnicas utilizadas para caracterização destes materiais comprovaram a produção de pós com elevada pureza e cristalinidade, e com tamanhos de partícula na escala micro e nanométrica. Foi também atingido o objetivo inicial almejado de aquisição de um pó bifásico constituído por quantidades equivalentes das fases de CaP mais utilizadas na biomedicina, o β -TCP e a HAp.

A proporção entre os polímeros de interesse mais adequada à produção das membranas compósitas, foi escolhida com base nos resultados de um ensaio mecânico preliminarmente realizado. Concluiu-se ser a membrana de composição QS/PEG=70/30% a que apresenta melhor resistência mecânica à tração, em conjunto com uma ótima capacidade de deformação. Tendo em conta o que foi obtido para as restantes proporções poliméricas, e através do estudo da literatura relevante, constatou-se que uma quantidade excessiva de PEG adicionada ao QS (QS/PEG=50/50%) tende a diminuir as forças atrativas intermoleculares entre ambos os polímeros. A existência destas ligações hidrogénio intermoleculares, maioritariamente desenvolvidas entre as porções amina do QS e os terminais hidroxilo do PEG, foi comprovada pela análise FTIR-ATR efetuada às membranas.

Os filmes compósitos produzidos com base na proporção polimérica selecionada e incorporando os pós inorgânicos, exibiu satisfatórias propriedades antibacterianas e mecânicas, e também uma boa capacidade de biomineralização e biodegradação. A membrana com a concentração em óxidos metálicos mínima inibitória (0,4 mg CuO + 0,4

mg ZnO) promoveu uma ação bacteriostática satisfatória contra os dois tipos de bactérias testadas, Gram-positiva e -negativa. Foi verificado que a bactéria Gram-positiva *S. aureus* apresentou maior sensibilidade ao material, sendo mais resistente a bactéria Gram-negativa *E. coli*, facto que pode ser justificado pela diferente composição e morfologia da parede celular de ambos os microrganismos. No que respeita às ligações químicas formadas na membrana compósita, constatou-se que, possivelmente, os aniões fosfato e os catiões divalentes provenientes dos pós promovem a reticulação da matriz polimérica através da formação de ligações com os grupos amina e hidroxilo presentes nas cadeias da matriz. Esta reticulação pode justificar a melhoria na capacidade de deformação da membrana dopada comparativamente à membrana de igual composição polimérica não dopada. O ensaio realizado em SBF permitiu concluir que o material apresentou uma biodegradação gradual ao longo do tempo de imersão, acompanhada de uma contínua deposição de partículas de CaP que originou a formação de uma camada apatítica uniforme à superfície da membrana. Esta capacidade de biomineralização, em conjunto com uma biodegradação adequada e uma boa capacidade de inibição do crescimento bacteriano, são qualidades de maior relevância para a finalidade de aplicação do material desenvolvido.

O balanço global dos resultados obtidos no âmbito deste trabalho, permitem concluir que a membrana compósita concebida apresenta aplicações potenciais na proteção de feridas superficiais, separação de tecidos moles e duros em cirurgias na área da medicina dentária (por exemplo), podendo ser também adequada para o revestimento de implantes ósseos, entre outras aplicações.

5.2. Trabalhos Futuros

Os resultados do presente estudo aparentam ser bastante promitentes e justificam a realização de trabalhos de investigação futuros. Deste modo, sugere-se: (i) a realização de um estudo mais aprofundado que permita apurar as condições ótimas de síntese dos óxidos metálicos na presença de ureia. Neste trabalho, apesar de terem sido produzidos pós de CuO e ZnO com ótimas qualidades, o rendimento de pó por síntese foi bastante baixo. Tal facto pode advir dos parâmetros implementados, como razão entre precursor metálico/ureia, ou duração e temperatura da reação. Existem escassos estudos neste âmbito, e, portanto, seria bastante inovador trabalhar nesse sentido; (ii) estudar a libertação dos iões metálicos e ROS para o meio envolvente ao longo do tempo, para melhor

compreensão do seu impacto na duração da ação antibacteriana das membranas; (iii) realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* que permitam apurar a biocompatibilidade do material desenvolvido; e (iv) investigar a eventual possibilidade de aplicação das membranas em sistemas de entrega controlada de fármacos.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografia

- (1) Williams, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, 29 (20), 2941–2953.
- (2) Veiga, A. S.; Schneider, J. P. Antimicrobial Hydrogels for the Treatment of Infection. *Biopolymers* **2013**, 100 (6), 637–644.
- (3) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, 34 (34), 8533–8554.
- (4) Mishra, S. K.; Raveendran, S.; Ferreira, J. M. F.; Kannan, S. *In Situ* Impregnation of Silver Nanoclusters in Microporous Chitosan-PEG Membranes as an Antibacterial and Drug Delivery Percutaneous Device. *Langmuir* **2016**, 32 (40), 10305–10316.
- (5) Tripathi, A.; Saravanan, S.; Pattnaik, S.; Moorthi, A.; Partridge, N. C.; Selvamurugan, N. Bio-Composite Scaffolds Containing Chitosan/nano-Hydroxyapatite/nano-Copper-Zinc for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 50 (1), 294–299.
- (6) Kalhapure, R. S.; Suleman, N.; Mocktar, C.; Seedat, N.; Govender, T. Nanoengineered Drug Delivery Systems for Enhancing Antibiotic Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 104 (3), 872–905.
- (7) Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; LeBlanc, C. L.; Ramamurthy, R.; Buchanan, K. L.; Nickerson, C. A. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal* **2002**, 78 (August 2008), 216–224.
- (8) Weiner, R.; Langille, S.; Quintero, E. Structure, Function and Immunochemistry of Bacterial Exopolysaccharides. *Journal of Industrial Microbiology* **1995**, 15 (4), 339–346.
- (9) Duarte, A. S.; Correia, A.; Esteves, A. C. Bacterial Collagenases - A Review. *Critical reviews in microbiology* **2014**, 7828 (January), 1–21.
- (10) Ki, V.; Rotstein, C. Bacterial Skin and Soft Tissue Infections in Adults: A Review of Their Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Site of Care. *Can.J.Infect.Dis.Med.Microbiol.* **2008**, 19 (2), 173–184.
- (11) Ribet, D.; Cossart, P. How Bacterial Pathogens Colonize Their Hosts and Invade Deeper Tissues. *Microbes and Infection* **2015**, 17 (3), 173–183.
- (12) Römling, U.; Balsalobre, C. Biofilm Infections, Their Resilience to Therapy and

- Innovative Treatment Strategies. *Journal of Internal Medicine* **2012**, 272 (6), 541–561.
- (13) Veerachamy, S.; Yarlagadda, T.; Manivasagam, G.; Yarlagadda, P. K. Bacterial Adherence and Biofilm Formation on Medical Implants: A Review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* **2014**, 228 (10), 1083–1099.
- (14) Anselme, K.; Davidson, P.; Popa, A. M.; Giazzon, M.; Liley, M.; Ploux, L. The Interaction of Cells and Bacteria with Surfaces Structured at the Nanometre Scale. *Acta Biomaterialia* **2010**, 6 (10), 3824–3846.
- (15) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Speziale, P.; Arciola, C. R. Antibiotic-Loaded Biomaterials and the Risks for the Spread of Antibiotic Resistance Following Their Prophylactic and Therapeutic Clinical Use. *Biomaterials* **2010**, 31 (25), 6363–6377.
- (16) Zavaglia, C. A. C.; Prado da Silva, M. H. Feature Article: Biomaterials. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* **2016**, 10, 1–5.
- (17) Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. *Elsevier* **2013**.
- (18) Williams, D. F. On the Nature of Biomaterials. *Biomaterials* **2009**, 30 (30), 5897–5909.
- (19) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Clinical Implications of Anti-Infective Biomaterials Andinfection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, 34 (33), 8018–8029.
- (20) Rai, M.; Ingle, A. P.; Gaikwad, S.; Gupta, I.; Gade, A.; Silvério da Silva, S. Nanotechnology Based Anti-Infectives to Fight Microbial Intrusions. *Journal of Applied Microbiology* **2016**, 120 (3), 527–542.
- (21) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2011**, 36 (8), 981–1014.
- (22) Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs* **2015** 13 (8), 5156–86.
- (23) Goy, R. C.; Britto, D. de; Assis, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros* **2009**, 19 (3), 241–247.

- (24) Ahmed, T. A.; Aljaeid, B. M. Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery. *Drug Design, Development and Therapy* **2016**, *10*, 483–507.
- (25) Ahmadi, F.; Oveisi, Z.; Samani, M.; Amoozgar, Z. Chitosan Based Hydrogels: Characteristics and Pharmaceutical Applications. *Research in Pharmaceutical Sciences* **2015**, *10* (1), 1–16.
- (26) Hosseinnajad, M.; Jafari, S. M. Evaluation of Different Factors Affecting Antimicrobial Properties of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *85*, 467–475.
- (27) Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (1), 1–21.
- (28) Kumar, M. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *46* (1), 1–27.
- (29) Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal* **2013**, *49* (4), 780–792.
- (30) Lalia, B. S.; Kochkodan, V.; Hashaikh, R.; Hilal, N. A Review on Membrane Fabrication: Structure, Properties and Performance Relationship. *Desalination* **2013**, *326* (October 2013), 77–95.
- (31) Campos, M. G. N.; Grosso, C. R. F.; Cárdenas, G.; Mei, L. H. I. Effects of Neutralization Process on Preparation and Characterization of Chitosan Membranes for Wound Dressing. *Macromolecular Symposia* **2005**, *229*, 253–257.
- (32) Suyatma, N. E.; Tighzert, L.; Copinet, A.; Coma, V. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (10), 3950–3957.
- (33) Domján, A.; Bajdik, J.; Pintye-Hódi, K. Understanding of the Plasticizing Effects of Glycerol and PEG 400 on Chitosan Films Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Macromolecules* **2009**, *42* (13), 4667–4673.
- (34) Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 116–127.
- (35) Muhd Julkapli, N.; Akil, H. M.; Ahmad, Z. Preparation, Properties and Applications

- of Chitosan-Based Biocomposites/Blend Materials: A Review. *Composite Interfaces* **2011**, 18 (6), 449–507.
- (36) Ganji, F.; Abdekhodaie, M. J. Synthesis and Characterization of a New Thermosensitive Chitosan-PEG Diblock Copolymer. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74 (3), 435–441.
- (37) Chang, S. J.; Niu, C. C.; Huang, C. F.; Kuo, S. M. Evaluation of Chitosan-G-PEG Copolymer for Cell Anti-Adhesion Application. *Journal of Medical and Biological Engineering* **2007**, 27 (1), 41–46.
- (38) Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62 (1), 83–99.
- (39) Palza, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, 16 (1), 2099–2116.
- (40) Surmenev, R. A.; Surmeneva, M. A.; Ivanova, A. A. Significance of Calcium Phosphate Coatings for the Enhancement of New Bone Osteogenesis - A Review. *Acta Biomaterialia* **2014**, 10 (2), 557–579.
- (41) Dumont, V. C.; Mansur, A. A. P.; Carvalho, S. M.; Medeiros Borsagli, F. G. L.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S. Chitosan and Carboxymethyl-Chitosan Capping Ligands: Effects on the Nucleation and Growth of Hydroxyapatite Nanoparticles for Producing Biocomposite Membranes. *Materials Science and Engineering C* **2016**, 59, 265–277.
- (42) Zhang, Z.; Kurita, H.; Kobayashi, H.; Kurashina, K. Osteoinduction with HA/TCP Ceramics of Different Composition and Porous Structure in Rabbits. *Oral Science International* **2005**, 2 (2), 85–95.
- (43) Juhasz, J. A.; Best, S. M. Bioactive Ceramics: Processing, Structures and Properties. *Journal of Materials Science* **2012**, 47 (2), 610–624.
- (44) Fielding, G.; Bose, S. SiO₂ and ZnO Dopants in Three-Dimensionally Printed Tricalcium Phosphate Bone Tissue Engineering Scaffolds Enhance Osteogenesis and Angiogenesis in Vivo. *Acta Biomaterialia* **2013**, 9 (11), 9137–9148.
- (45) Eliaz, N.; Metoki, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials* **2017**, 10 (4).
- (46) Dziadek, M.; Stodolak-Zych, E.; Cholewa-Kowalska, K. Biodegradable Ceramic-

- Polymer Composites for Biomedical Applications: A Review. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *71*, 1175–1191.
- (47) Ebrahimi, M.; Botelho, M. G.; Dorozhkin, S. V. Biphasic Calcium Phosphates Bioceramics (HA/TCP): Concept, Physicochemical Properties and the Impact of Standardization of Study Protocols in Biomaterials Research. *Materials Science and Engineering C* **2017**, *71* (December), 1293–1312.
- (48) Li, M.; Ke, Q.-F.; Tao, S.-C.; Guo, S.-C.; Rui, B.-Y.; Guo, Y.-P. Fabrication of Hydroxyapatite/chitosan Composite Hydrogels Loaded with Exosomes Derived from miR-126-3p Overexpressed Synovial Mesenchymal Stem Cells for Diabetic Chronic Wound Healing. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (42), 6830–6841.
- (49) Saravanan, S.; Leena, R. S.; Selvamurugan, N. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan Based Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *93*, 1354–1365.
- (50) Mantecca, P.; Moschini, E.; Bonfanti, P.; Fascio, U.; Perelshtein, I.; Lipovsky, A.; Chirico, G.; Bacchetta, R.; Del Giacco, L.; Colombo, A.; et al. Toxicity Evaluation of a New Zn-Doped CuO Nanocomposite with Highly Effective Antibacterial Properties. *Toxicological Sciences* **2015**, *146* (1), 16–30.
- (51) Rajasekaran, P.; Santra, S. Hydrothermally Treated Chitosan Hydrogel Loaded with Copper and Zinc Particles as a Potential Micronutrient-Based Antimicrobial Feed Additive. *Frontiers in Veterinary Science* **2015**, *2* (November), 1–9.
- (52) Malka, E.; Perelshtein, I.; Lipovsky, A.; Shalom, Y.; Naparstek, L.; Perkas, N.; Patick, T.; Lubart, R.; Nitzan, Y.; Banin, E.; et al. Eradication of Multi-Drug Resistant Bacteria by a Novel Zn-Doped CuO Nanocomposite. *Small* **2013**, *9* (23), 4069–4076.
- (53) Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Understanding of Dopant-Induced Osteogenesis and Angiogenesis in Calcium Phosphate Ceramics. *Trends in Biotechnology* **2013**, *31* (10), 594–605.
- (54) Graziani, V.; Fosca, M.; Egorov, A. A.; Zobkov, Y. V.; Fedotov, A. Y.; Baranchikov, A. E.; Ortenzi, M.; Caminiti, R.; Komlev, V. S.; Rau, J. V. Zinc-Releasing Calcium Phosphate Cements for Bone Substitute Materials. *Ceramics International* **2016**, *42* (15), 17310–17316.

- (55) Dizaj, S. M.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M. H.; Adibkia, K. Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxide Nanoparticles. *Materials Science and Engineering C* **2014**, *44*, 278–284.
- (56) Zazo, H.; Colino, C. I.; Lanao, J. M. Current Applications of Nanoparticles in Infectious Diseases. *Journal of Controlled Release* **2016**, *224*, 86–102.
- (57) Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N. H. M.; Ann, L. C.; Bakhori, S. K. M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters* **2015**, *7* (3), 219–242.
- (58) El, A. M.; El-fattah, M. A.; Azzam, A. M.; Dardir, M. M.; Bader, M. M. International Journal of Biological Macromolecules Synthesis of Cuprous Oxide Epoxy Nanocomposite as an Environmentally Antimicrobial Coating. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *89*, 190–197.
- (59) Esfahani, H.; Salahi, E.; Tayebifard, a.; Rahimipour, M. R.; Keyanpour-Rad, M. Influence of Zinc Incorporation on Microstructure of Hydroxyapatite to Characterize the Effect of pH and Calcination Temperatures. *Journal of Asian Ceramic Societies* **2014**, *2* (3), 248–252.
- (60) Nguyen, T.-D. From Formation Mechanisms to Synthetic Methods toward Shape-Controlled Oxide Nanoparticles. *Nanoscale* **2013**, *5* (20), 9455–9482.
- (61) Parthiban, S. P.; Kim, I. Y.; Kikuta, K.; Ohtsuki, C. Effect of Urea on Formation of Hydroxyapatite through Double-Step Hydrothermal Processing. *Materials Science and Engineering C* **2011**, *31* (7), 1383–1388.
- (62) Yan, T.; Wang, X.; Long, J.; Liu, P.; Fu, X.; Zhang, G.; Fu, X. Urea-Based Hydrothermal Growth, Optical and Photocatalytic Properties of Single-Crystalline In(OH)₃ Nanocubes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *325* (2), 425–431.
- (63) Mohammadi, Z.; Sheikh-Mehdi Mesgar, A.; Rasouli-Disfani, F. Preparation and Characterization of Single Phase, Biphasic and Triphasic Calcium Phosphate Whisker-like Fibers by Homogenous Precipitation Using Urea. *Ceramics International* **2015**, *42* (6), 6955–6961.
- (64) Ada, K.; Gökgöz, M.; Önal, M.; Sarikaya, Y. Preparation and Characterization of a ZnO Powder with the Hexagonal Plate Particles. *Powder Technology* **2008**, *181* (3), 285–291.

- (65) Ma, W.; Ren, B.; Huang, Z.; Chen, Q.; Cao, X.; Guo, Y. Mesosstructured Zinc Oxide Architectures with High Photocatalytic Activity. *Materials Chemistry and Physics* **2017**, *186*, 341–352.
- (66) Srikanth, C. K.; Jeevanandam, P. Effect of Anion on the Homogeneous Precipitation of Precursors and Their Thermal Decomposition to Zinc Oxide. *Journal of Alloys and Compounds* **2009**, *486* (1–2), 677–684.
- (67) Wang, Y.; Wang, J.; Chen, H.; Yao, M.; Li, Y. Preparation and NO_x-Assisted Soot Oxidation Activity of a CuO-CeO₂ Mixed Oxide Catalyst. *Chemical Engineering Science* **2015**, *135*, 294–300.
- (68) Baker, M. J.; Trevisan, J.; Bassan, P.; Bhargava, R.; Butler, H. J. Using Fourier Transform IR Spectroscopy to Analyze Biological Materials. *Nat Protoc* **2015**, *9* (8), 1771–1791.
- (69) American Society for Testing and Materials. D 882 – 02: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **2002** (West Conshohocken).
- (70) Xu, J.; Li, Z.; Xu, P.; Xiao, L.; Yang, Z. Nanosized Copper Oxide Induces Apoptosis through Oxidative Stress in Podocytes. *Archives of Toxicology* **2013**, *87* (6), 1067–1073.
- (71) Rodhe, Y.; Skoglund, S.; Odnevall Wallinder, I.; Potáková, Z.; Möller, L. Copper-Based Nanoparticles Induce High Toxicity in Leukemic HL60 Cells. *Toxicology in Vitro* **2015**, *29* (7), 1711–1719.
- (72) Saranya, S.; Vijayaranai, K.; Pavithra, S.; Raihana, N.; Kumanan, K. In Vitro Cytotoxicity of Zinc Oxide, Iron Oxide and Copper Nanopowders Prepared by Green Synthesis. *Toxicology Reports* **2017**, *4* (February), 427–430.
- (73) Alishah, H.; Pourseyedi, S.; Ebrahimipour, S. Y.; Mahani, S. E.; Rafiei, N. Green Synthesis of Starch-Mediated CuO Nanoparticles: Preparation, Characterization, Antimicrobial Activities and in Vitro MTT Assay against MCF-7 Cell Line. *Rendiconti Lincei* **2017**, *28* (1), 65–71.
- (74) Chakraborty, R.; Sarkar, R. K.; Chatterjee, A. K.; Manju, U.; Chattopadhyay, A. P.; Basu, T. A Simple, Fast and Cost-Effective Method of Synthesis of Cupric Oxide Nanoparticle with Promising Antibacterial Potency: Unraveling the Biological and Chemical Modes of Action. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2015**, *1850* (4), 845–856.

- (75) Ahamed, M.; Alhadlaq, H. A.; Khan, M. A. M.; Karuppiyah, P.; Al-dhabi, N. A. Synthesis , Characterization , and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* **2014**, 2014, 1–4.
- (76) Li, Z.; Yang, R.; Yu, M.; Bai, F.; Li, C.; Wang, Z. L.; Li, Z.; Yang, R.; Yu, M.; Bai, F.; et al. Cellular Level Biocompatibility and Biosafety of ZnO Nanowires Cellular Level Biocompatibility and Biosafety of ZnO Nanowires. **2008**, 112 (November), 20114–20117.
- (77) Moghaddam, A. B.; Moniri, M.; Azizi, S.; Rahim, R. A.; Ariff, A. Bin; Saad, W. Z.; Namvar, F.; Navaderi, M.; Mohamad, R. Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by a New *Pichia Kudriavzevii* Yeast Strain and Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules* **2017**, 22 (6).
- (78) Pati, R.; Mehta, R. K.; Mohanty, S.; Padhi, A.; Sengupta, M.; Vaseeharan, B.; Goswami, C.; Sonawane, A. Topical Application of Zinc Oxide Nanoparticles Reduces Bacterial Skin Infection in Mice and Exhibits Antibacterial Activity by Inducing Oxidative Stress Response and Cell Membrane Disintegration in Macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2014**, 10 (6), 1195–1208.
- (79) Jayasuriya, A. C.; Aryaei, A.; Jayatissa, A. H. ZnO Nanoparticles Induced Effects on Nanomechanical Behavior and Cell Viability of Chitosan Films. *Materials Science and Engineering C* **2013**, 33 (7), 3688–3696.
- (80) Shavandi, A.; Bekhit, A. E. D. A.; Ali, M. A.; Sun, Z.; Gould, M. Development and Characterization of Hydroxyapatite/ β -TCP/chitosan Composites for Tissue Engineering Applications. *Materials Science and Engineering C* **2015**, 56, 481–493.
- (81) American Society for Testing and Materials. E2149-13a: Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. **2013** (Pennsylvania).
- (82) International Organization for Standardization. ISO 23317: Evaluation for Apatite-Forming Ability. **2012** (Switzerland).
- (83) Popa, A. C.; Stan, G. E.; Husanu, M. A.; Mercioniu, I.; Santos, L. F.; Fernandes, H. R.; Ferreira, J. M. F. Bioglass Implant-Coating Interactions in Synthetic Physiological Fluids with Varying Degrees of Biomimicry. *International Journal of Nanomedicine* **2017**, 12, 683–707.

- (84) Lala, S.; Satpati, B.; Pradhan, S. K. Sintering Behavior and Growth Mechanism of β -TCP in Nanocrystalline Hydroxyapatite Synthesized by Mechanical Alloying. *Ceramics International* **2016**, 42 (11), 13176–13182.
- (85) Zhang, Y.; Lu, J.; Yang, S. Preparation of Hydroxyapatite Ceramic through Centrifugal Casting Process Using Ultra-Fine Spherical Particles as Precursor and Its Decomposition at High Temperatures. *Journal of Advanced Ceramics* **2012**, 1 (1), 60–65.
- (86) Kundu, B.; Lemos, A.; Soundrapandian, C.; Sen, P. S.; Datta, S.; Ferreira, J. M. F.; Basu, D. Development of Porous HAp and β -TCP Scaffolds by Starch Consolidation with Foaming Method and Drug-Chitosan Bilayered Scaffold Based Drug Delivery System. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, 21 (11), 2955–2969.
- (87) Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; O'Connor, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chemical Reviews* **2004**, 104 (9), 3893–3946.
- (88) Shokry Hassan, H.; Elkady, M. F.; El-Shazly, A. H.; Bamufleh, H. S. Formulation of Synthesized Zinc Oxide Nanopowder into Hybrid Beads for Dye Separation. *Journal of Nanomaterials* **2014**, 2014.
- (89) Husairi, F. S.; Ali, S. M.; Azlinda, A.; Rusop, M.; Abdullah, S. Special Effect of Urea as a Stabilizer in Thermal Immersion Method to Synthesis Porous Zinc Oxide Nanostructures. *Journal of Nanomaterials* **2013**, 2013.
- (90) Sowri Babu, K.; Ramachandra Reddy, A.; Sujatha, C.; Venugopal Reddy, K.; Mallika, A. N. Synthesis and Optical Characterization of Porous ZnO. *Journal of Advanced Ceramics* **2013**, 2 (3), 260–265.
- (91) Pholnak, C.; Sirisathitkul, C.; Suwanboon, S.; Harding, D. J. Effects of Precursor Concentration and Reaction Time on Sonochemically Synthesized ZnO Nanoparticles. *Materials Research* **2014**, 17 (2), 405–411.
- (92) Sankar, R.; Manikandan, P.; Malarvizhi, V.; Fathima, T.; Shivashangari, K. S.; Ravikumar, V. Green Synthesis of Colloidal Copper Oxide Nanoparticles Using Carica Papaya and Its Application in Photocatalytic Dye Degradation. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, 121 (75), 746–750.

- (93) Phiwdang, K.; Suphankij, S.; Mekprasart, W.; Pecharapa, W. Synthesis of CuO Nanoparticles by Precipitation Method Using Different Precursors. *Energy Procedia* **2013**, *34*, 740–745.
- (94) Jiang, W. H.; Han, S. J. Study of Interaction between Polyethylene Glycol and Chitosan by Viscosity Method. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1998**, *36* (8), 1275–1281.
- (95) Zhang, M.; Li, X. H.; Gong, Y. D.; Zhao, N. M.; Zhang, X. F. Properties and Biocompatibility of Chitosan Films Modified by Blending with PEG. *Biomaterials* **2002**, *23* (13), 2641–2648.
- (96) Du, J.; Hsieh, Y. Lo. PEGylation of Chitosan for Improved Solubility and Fiber Formation via Electrospinning. *Cellulose* **2007**, *14* (6), 543–552.
- (97) Buranachai, T.; Praphairaksit, N.; Muangsin, N. Chitosan/Polyethylene Glycol Beads Crosslinked with Tripolyphosphate and Glutaraldehyde for Gastrointestinal Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11* (3), 1128–1137.
- (98) Mallamace, F.; Corsaro, C.; Mallamace, D.; Vasi, S.; Vasi, C.; Dugo, G. The Role of Water in Protein's Behavior: The Two Dynamical Crossovers Studied by NMR and FTIR Techniques. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2015**, *13* (November 2014), 33–37.
- (99) Ahmad, M. Bin; Tay, M. Y.; Shameli, K.; Hussein, M. Z.; Lim, J. J. Green Synthesis and Characterization of Silver/chitosan/polyethylene Glycol Nanocomposites without Any Reducing Agent. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12* (8), 4872–4884.
- (100) Corsello, F. A.; Bolla, P. A.; Anbinder, P. S.; Serradell, M. A.; Amalvy, J. I.; Peruzzo, P. J. Morphology and Properties of Neutralized Chitosan-Cellulose Nanocrystals Biocomposite Films. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *156*, 452–459.
- (101) Wahid, F.; Yin, J. J.; Xue, D. D.; Xue, H.; Lu, Y. S.; Zhong, C.; Chu, L. Q. Synthesis and Characterization of Antibacterial Carboxymethyl Chitosan/ZnO Nanocomposite Hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *88*, 273–279.
- (102) Jiang, W.; Saxena, A.; Song, B.; Ward, B. B.; Beveridge, T. J.; Myneni, S. C. B. Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy. *Langmuir* **2004**, *20* (26), 11433–11442.

- (103) Bala, N.; Sarkar, M.; Maiti, M.; Nandy, P.; Basu, R.; Das, S. Phenolic Compound-Mediated Single-Step Fabrication of Copper Oxide Nanoparticles for Elucidating Their Influence on Anti-Bacterial and Catalytic Activity. *New J. Chem.* **2017**, *41* (11), 4458–4467.
- (104) Lee, S. T.; Mi, F. L.; Shen, Y. J.; Shyu, S. S. Equilibrium and Kinetic Studies of Copper (II) Ion Uptake by Chitosan-Tripolyphosphate Chelating Resin. *Polymer* **2001**, *42*, 1879–1892.
- (105) Kyzas, G. Z.; Deliyanni, E. A. Mercury(II) Removal with Modified Magnetic Chitosan Adsorbents. *Molecules* **2013**, *18* (6), 6193–6214.
- (106) Cai, Y.; Zheng, L.; Fang, Z. Selective Adsorption of Cu(II) from an Aqueous Solution by Ion Imprinted Magnetic Chitosan Microspheres Prepared from Steel Pickling Waste Liquor. *RSC Adv.* **2015**, *5* (118), 97435–97445.